

**Zur Chemie und Pharmakologie
der Folia Sennae**

Wolfgang Schiemmer

Zur Chemie und Pharmakologie der Folia Sennae

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Wolfgang Schlemmer

aus

München

November 1951



1. Berichterstatter: Professor Dr. L. HÖRHAMMER und
Professor Dr. K. ZIPF
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. BAMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 57

I. Einleitung

Ein teil un g

	Seite
I. Einleitung	1
II. Chemischer Teil	3
A) Bisherige Arbeiten	3
B) Eigene Untersuchungen	5
C) Experimenteller Teil	25
D) Zusammenfassung	32
III. Pharmakologischer Teil	33
A) Bisherige Arbeiten und Theorien über die Abführwirkung der Sennesblätter und der Flavonole	33
B) Auswahl geeigneter Methoden	41
C) Eigene Untersuchungen	50
D) Diskussion	71
IV. Gesamtzusammenfassung	74

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Die Sennesblätter, eine seit dem 9. Jahrhundert bekannt. Abführdroge¹⁾, enthalten neben den Hauptwirkstoffen Sennosid A und Sennosid B noch eine Reihe anderer Inhaltsstoffe. Unter diesen isolierte 1913 F. TUTIN²⁾ das Flavonolderivat Kämpferol und dessen Diglukosid Kämpferin.

Unabhängig davon schrieb T. FUKUDA³⁾ 1932 einem wasserlöslichen Kämpferolglykosid eine abführende Wirkung zu.

Auf diese japanische Arbeit bezieht sich vermutlich R. JARETZKY⁴⁾, wenn er in seinem "Lehrbuch der Pharmakognosie" schreibt: "Kämpferol und dessen Glykosid Kämpferin zeichnen sich durch starke Abführwirkung aus".

In späteren Abhandlungen und Übersichtsreferaten über die Pharmakologie der Flavone weisen O. GESSNER⁵⁾, O. ISAAC⁶⁾, E. STEINEGGER⁷⁾ und J. J. WILLAMAN⁸⁾ immer wieder auf diese Angaben hin.

Neuerdings berichteten auch L. SCHMIDT und E. SEEGER⁹⁾, daß das Flavonolderivat Quercetin eine schwach abführende Wirkung zeigt.

Alle diese Angaben stützen die 1951 von I. W. FAIRBAIRN und M. R. I. SALEH¹⁰⁾ gemachte Feststellung, daß uen Anthranol-

-
- | | |
|--|--|
| 1) MADAUS, G. | Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Leipzig 1938, Abt. I, Heilpflanzen, Band III, S. 2536. |
| 2) TUTIN, F. | Proc. Chem. Soc. <u>278</u> , 2006 (1913) |
| 3) FUKUDA, T. | Arch. exp. Pathol. Pharmacol. <u>164</u> , 685 (1932) |
| 4) JARETZKY, R. | Lehrbuch der Pharmakognosie, Braunschweig 1949, S. 100 |
| 5) GESSNER, O. | Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, Heidelberg 1953, S. 228 |
| 6) ISAAC, O. | Pharmaz. Ztg. <u>102</u> , 71 (1957) |
| 7) STEINEGGER, E. | Mitt. dtsch. pharmaz. Ges. <u>27</u> , 66 (1957) |
| 8) WILLAMAN, J. J. | J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. <u>44</u> , 404 (1955) |
| 9) SCHMIDT, L. u. SEEGER, E. | Arzneimittel-Forsch. <u>6</u> , 22 (1956) |
| 10) FAIRBAIRN, J. W. u. J. SALEH, M. R. I. | Pharmacy Pharmacol. <u>3</u> , 93 u. 918 (1951) |

glykosiden Sennosid A und Sennosid B nicht die ganze abführende Wirkung der Sennesdröge zukommt, sondern daß an ihrer abführenden Wirkung noch eine andere Komponente additiv oder potenzierend beteiligt sein muß.

Es schien deshalb von Interesse zu prüfen, ob den Flavonolderivaten der Sennesblätter selbst eine abführende Wirkung zukommt, bzw. ob diese die Abführwirkung der Anthranolglykoside synergistisch verstärken.

Für unsere Versuche war dabei wesentlich, daß die Chemie der Hauptwirkstoffe von A. STOLL und Mitarbeitern¹¹⁾ geklärt worden war und diese in dem Handelspräparat "Pursennid (R)" als definierte Standardsubstanz zur Verfügung standen. Wir konnten sie somit in verschiedenen Konzentrationen mit Flavonolen kombinieren.

Um zu klären, ob die Flavonole tatsächlich einen Effekt in dieser speziellen pharmakologischen Richtung besitzen, sollte zunächst geprüft werden, welche Flavonole außer den von F. TUTIN²⁾ festgestellten noch in den Blättern vorkommen; die genaue Kenntnis der flavonolischen Inhaltsstoffe bzw. die erhaltenen isolierten Reinsubstanzen würden es ermöglichen, "Pursennid (R)" gezielt zu dosieren und verschiedene Kombinationen auf ihre pharmakologische Wirkung zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke waren wir bestrebt, eine pharmakologische Methode zu finden, die sowohl eine sichere Aussage über die Abführwirkung von Flavonolkörpern als auch über eine Verstärkung der Abführwirkung von Anthrachinonderivaten zuließ.

Die pharmakologischen Versuche waren sodann an Hand von größerem Tiermaterial durchzuführen, so daß statistisch gesicherte Werte die Frage der Abführwirkung von Flavonolderivaten beantworten konnten.

-
- 11) STOLL, A., BECKER, B. a) Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 235 (1941)
HELFFENSTEIN, A. u. b) Helv. chim. Acta 30, 59 (1947)
KUSSMAUL, W. c) Helv. chim. Acta 32, 1892 (1949)
d) Helv. chim. Acta 33, 313 (1950)
2) TUTIN, F. Proc. Chem. Soc. 278, 2006 (1913)

II. Chemischer Teil

A. Bisherige Arbeiten über die Flavonolkörper der Folia Sennae

In dem Bemühen, das wirksame Prinzip der Sennesblätter zu entdecken, gelang es F. TUTIN²⁾ zwar nicht, die sehr hydrophilen Sennoside A und B zu erfassen, aber er isolierte aus 22 kg Folia Sennae Tinnevelly, einer in Indien beheimateten Sorte, eine Reihe bisher darin nicht nachgewiesener Substanzen. Er perkolierte die Droge mit heißem Alkohol, dampfte ein und verdünnte mit Wasser. Vom ausgeschiedenen Chlorophyll filtrierte er ab und schüttelte nacheinander erschöpfend mit Äther und Amylalkohol aus. Nach Eindampfen der vereinigten Amylalkoholfractionen fiel ein amorpher brauner Niederschlag aus, den F. TUTIN²⁾ in kochendem Alkohol löste, Tierkohle zusetzte und mit Wasser verdünnte. Nach einer "Zeit von 5 Monaten" erhielt er Kristalle, die er aus Wasser umkristallisierte und die zwischen 185° C und 195° C schmolzen. Nach der Hydrolyse mit verdünnter H₂SO₄ ergaben sich die Komponenten Kämpferol und Dextrose. Auf Grund von CH-Bestimmungen ermittelte F. TUTIN²⁾ 2 Moleküle Zucker pro 1 Molekül Kämpferol mit 6 Molekülen Kristallwasser. Für das isolierte Kämpferoldiglukosid schlug er den Namen Kämpferin vor. Gleichzeitig untersuchte F. TUTIN²⁾ die aus Ägypten stammenden Folia Sennae Alexandrini und fand in diesen nach Hydrolyse von Extrakten neben Kämpferol das Aglykon Isorhamnetin, ohne über die Art der Glykoside nähere Angaben zu machen.

Mit Flavonolkörpern aus den Folia Sennae Tinnevelly beschäftigten sich dann 1940 auch B. R. MURTI und T. R. SESHADRI¹²⁾. Nach Kochen und Bleiacetatfällung eines wäßrigen Sennaextraktes erhielten sie die beiden Flavonolaglykone Kämpferol und Isorhamnetin in etwa gleicher Menge.

2) TUTIN, F. Proc. Chem. Soc. 278, 2006 (1913).

12) MURTI, B. R. u. SESHADRI, T. R. Chem. Zentralblatt 111, 2503 (1940, I).

A. STOLL und Mitarbeiter¹¹⁾, die als erste das wirksame Prinzip der *Folia Sennae* entdeckten und die Hauptinhaltsstoffe kristallin isolierten, machten keine näheren Angaben über Flavonkörper; sie erwähnten nur, daß beim Isolierungsgang nach Ausfällen der Sennoside als Calciumsalze in ammoniakalischem Milieu "Verunreinigungen" gelöst zurückbleiben. Dabei dürfte es sich um Flavonolkörper handeln.

Eine papierelektrophoretische Arbeit von A. ROUX¹³⁾, die sich u.a. auch mit den *Folia Sennae* beschäftigte, stellte nur ganz allgemein ohne weitere Detaillierung das Vorhandensein von Flavonzonen fest.

Somit waren in zwei verschiedenen Arten der Sennesblätter, den *Folia Sennae Tinnevely* von *Cassia angustifolia* Vahl und den *Folia Sennae Alexandrini* von *Cassia acutifolia* Del., aus der Familie der Caesalpinaceen, zwei definierte Flavonolderivate, Kämpferol und Isorhamnetin, aufgefunden worden. Bei *Senna Tinnevely* war dabei das Vorliegen des Kämpferols in einer Diglukosidform festgestellt worden. Die Kristalle dieses Glykosids hatte F. TUTIN²⁾ wohl mehr oder weniger zufällig erhalten, was daraus hervorgeht, daß die Kristalle sich erst nach einer Zeit von fünf Monaten abschieden und ein Schmelzpunktsintervall von 10° aufwiesen.

-
- 11) STOLL, A., BECKER, B., a) Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 235 (1947)
HELFFENSTEIN, A. u. b) Helv. chim. Acta 30, 59 (1947)
KUSSMAUL, W. c) Helv. chim. Acta 32, 1892 (1949)
d) Helv. chim. Acta 33, 313 (1950)
13) ROUX, A. Ann. pharmac. franc. 14, 212 (1956)
2) TUTIN, F. Proc. Chem. Soc. 278, 2006 (1913)

B. Eigene Untersuchungen

1. Versuch der Isolierung von Kämpferin aus Folia Sennae

Wir arbeiteten zunächst nach der von F. TUTIN²⁾ angegebenen Methode. Um das Vorhandensein von Flavonolkörpern in den einzelnen Ausschüttelungen zu überprüfen, bedienten wir uns der papierchromatographischen Untersuchungsmethode.

Folia Sennae Tinnevelly concis. wurden mit Äthanol extrahiert. Nach einem Reinigungsprozeß wurde zunächst mit Chloroform und sodann mit Amylalkohol erschöpfend ausgeschüttelt. Nach papierchromatographischer Überprüfung enthielten die Amylalkoholfraktionen zwar flavonolische Bestandteile, gleichzeitig jedoch ungewöhnlich viel Verunreinigungen und Ballaststoffe. Der Versuch, die Droge zuerst mit Petroläther, Äther oder Chloroform auszuziehen, verlief negativ. In den Äthylalkohol und damit später auch in die Amylalkoholausschüttelungen ging ein noch größerer Anteil an Verunreinigungen über. Anscheinend hatten die durch die genannten Lösungsmittel herausgelösten Ballaststoffe eine große Menge von mehr hydrophilen Ballaststoffen zurückgehalten, während diese hydrophileren Stoffe nunmehr leichter in den Äthanol und damit auch in den Amylalkohol gelangten. Wir versuchten dann, die Droge mit anderen Lösungsmitteln zu extrahieren und verwendeten dabei Äthylacetat und Gemische davon mit Äthanol und Methanol; diese Lösungsmittel enthielten andererseits verhältnismäßig wenig an flavonolischen Bestandteilen, wie der papierchromatographische Vergleich mit den anderen Chromatogrammen ergab.

Im Laufe unserer weiteren Untersuchungen gingen wir dazu über, die Droge von Anfang an mit kaltem Amylalkohol auszuziehen. Wir stellten dabei fest, daß die Auszüge verhältnismäßig viel Flavonolderivate und wenig Ballaststoffe enthielten. Vor allem waren die roten Flecken von Anthrachinonderivaten auf den Chromatogrammen sehr schwach ausgeprägt. Es gelang uns

2) TUTIN, F.

Proc. Chem. Soc. 278, 2006 (1913)

aber nicht, diese Spuren von Anthranolglykosiden nach A. STOLL¹¹⁾ als Calciumsalze abzutrennen, da bei p_H 10, der zu diesem Vorgang nötig ist, Flavonolderivate abgebaut werden.

Die Amylalkoholauszüge wurden nach F. TUTIN²⁾ weiter verarbeitet. Trotzdem hatten wir nach 8 Monaten bei keinem von sechs angesetzten Versuchen Kristalle erhalten. Auch der orientierende Versuch, über eine Cellulosesäule eine Abtrennung der noch vorhandenen Anthrachinone und Ballaststoffe zu erreichen, verlief ergebnislos. F. TUTIN²⁾ hatte seine Kristalle nach 5 Monaten bekommen und einen Schmelzpunkt zwischen $185^{\circ}C$ und $195^{\circ}C$ angegeben. Es dürfte sich dabei nicht um ein reines Kämpferoldiglucosid gehandelt haben.

Die negativen Resultate dieser Kristallisierungsversuche nach F. TUTIN²⁾ waren jedoch für den Fortgang unserer in pharmakologischer Richtung gezielten Arbeit nicht entscheidend.

2. Beobachtung von vier verschiedenen Flavonolsubstanzen während der Isolierungsversuche

Die papierchromatographische Untersuchung hatte ergeben, daß in den zur Kristallisation stehenden Lösungen verhältnismäßig viel Flavonolderivate enthalten waren. Es war uns dabei aufgefallen, daß die mit Aluminiumchlorid besprühten Chromatogramme, besonders wenn sie etwas weiter durchgelaufen waren (System Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser, 10+2+3), keinen einheitlichen Fleck enthielten. Der Fleck zog sich mehr oder weniger auseinander. Wir änderten deshalb das Lösungsmittelsystem und fanden dabei in Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) ein Gemisch, das nach ca. 48 Stunden Durchlaufzeit den einen Fleck in vier mit Aluminiumchlorid unter der UV-Lampe gelb fluoreszierende Zonen aufteilte.

-
- 11) STOLL, A., BECKER, B., a) Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 235
HELFFENSTEIN, A. u. (1941)
KUSSMAUL, W. b) Helv. chim. Acta 30, 59 (1947)
c) Helv. chim. Acta 32, 1892 (1949)
d) Helv. chim. Acta 33, 313 (1950)
2) TUTIN, F. Proc. Chem. Soc. 278, 2006 (1913)

Da es sich herausgestellt hatte, daß die Isolierung von Kämpferin oder anderen Sennaflavonolen nur sehr schwer möglich war - eine andere Arbeit an unserem Institut beschäftigt sich zur Zeit mit der Isolierung von hydrophilen Flavonolglykosiden - mußten wir uns damit begnügen, die vier Flavonolsubstanzen papierchromatographisch zu identifizieren. Neben dem Vergleich mit R_f -Werten anderer Flavonolderivate und Farbreaktionen auf den Chromatogrammen, hatten wir dabei die Möglichkeit, nach Eluierung der einzelnen Substanzen diese zu hydrolysieren und auf diese Weise die Aglykone und die Zuckerbestandteile der vier beobachteten Flavonolderivate zu identifizieren; nach Erreichung dieses Zieles konnten für unsere pharmakologischen Versuche gleiche oder weitgehend ähnliche Substanzen auf andere Weise beschafft werden.

3. Papierchromatographische und spektrophotometrische Identifizierung von vier Flavonolglykosiden

a) Nachweis von vier Flavonolglykosiden

Wir stellten wiederum kalte Amylalkoholextrakte der *Folia Sennae* her. Den Amylalkohol dampften wir im Vakuum ab, nahmen den Rückstand in Wasser auf und filtrierten vom Ungelösten ab. Das Filtrat wurde weitgehend eingeengt und im System Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) chromatographiert. Wir fertigten Durchlaufchromatogramme an, wozu eine Zeit von ca. 50 Stunden nötig war. Unbesprüht waren nach dem Trocknen unter der UV-Lampe vier dunkel fluoreszierende Flecken zu sehen. Nach dem Besprühen mit Aluminiumchlorid und Zirkonoxychlorid fluoreszierten die Substanzen in gelblichen Farbtönen, während nach dem Besprühen mit basischem Bleiacetat drei Flecke gelb und ein Fleck orange unter der UV-Lampe erschien. Schematisch sah ein mit Bleiacetat besprühtes Durchlaufchromatogramm folgendermaßen aus (siehe Abb. 1, S. 8). In der Reihenfolge von oben nach unten benannten wir die vier Flavonolsubstanzen mit G_1 , G_2 , G_3 und G_4 .

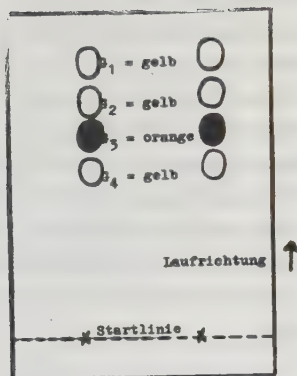
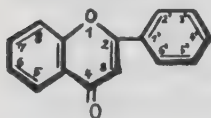
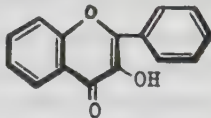


Abb. 1

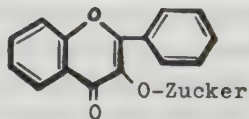
Das Verhalten vor der UV-Lampe in besprühtem und unbesprühtem Zustand deutete auf das Vorliegen von Substanzen hin, die am C_3 -Atom keine freie OH-Gruppe trugen, also wahrscheinlich auf Flavonolglykoside (die in den Folia Sennae bereits beschriebenen Aglykone Kämpferol und Isorhamnetin gehören zu den Flavonolen), deren C_3 -OH-Gruppe durch Zuckerbindung besetzt ist oder auf Flavone, die in C_3 -Stellung keine OH-Gruppe besitzen (L. HÖRHAMMER u. R. HÄNSEL¹⁴⁾¹⁵⁾).



Flavon



Flavonol



Flavonol-3-glykosid

- | | |
|---|---|
| <p>14) HÖRHAMMER, L. u.
HÄNSEL, R.</p> <p>15) HÖRHAMMER, L. u.
HÄNSEL, R.</p> | <p>Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz.
Ges. <u>284</u>, 276 (1951)</p> <p>Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz.
Ges. <u>287</u>, 310 (1954)</p> |
|---|---|

Um die Laufweite der vier Flavonolsubstanzen in normalen Chromatogrammen zu bestimmen, fertigten wir mehrere Streifenchromatogramme an und eluierten daraus die vier Substanzen G_1 bis G_4 . Nach dem erneuten Auftragen der eingedunsteten Eluate erhielten wir im UV-Licht folgendes Chromatogrammbild (Butanol-Eisessig-Wasser, 5+4+1, Laufzeit 20 Stunden, Sprühreagens basisches Bleiacetat):

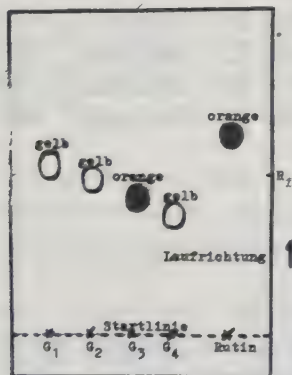


Abb. 2

Die R_F -Werte im Vergleich zu mitgelaufenem Rutin ($R_F = 0,57$) betragen als Mittelwerte mehrerer Chromatogramme:

G_1	$R_F = 0,53$
G_2	$R_F = 0,48$
G_3	$R_F = 0,46$
G_4	$R_F = 0,42$

Da Rutin zu den tieftestsitzenden bekannten Flavonolkörpern gehört, konnte ein Mitlaufenlassen anderer Vergleichssubstanzen keine weiteren Anhaltspunkte bringen.

Mit den eluierten Lösungen der Substanzen $G_1 - G_4$ führten wir den Zirkon-Zitronensäure-Test nach L. HÖRHAMMER und R. HÄNSEL¹⁴⁾¹⁵⁾ durch. Der Farbkomplex mit Zirkonoxychlorid wurde bei sämtlichen vier Substanzen gelöscht und trat nach Zusatz von HCl wieder auf. Somit ist bei allen vier Flavonolglykosiden die O_3 -Stellung durch eine Zuckerbindung besetzt.

Die Eluatlösungen wurden weiterhin dazu benützt, die Absorptionskurven der vier Glykoside $G_1 - G_4$ aufzunehmen. Die Kurven der Flavonolglykoside zeigten einen typischen Verlauf und wiesen folgende Maxima auf:

G_1	Maximum _I bei 2650 Å,	Maximum _{II} bei 3550 Å
G_2	Maximum _I bei 2550 Å,	Maximum _{II} bei 3600 Å
G_3	Maximum _I bei 2550 Å,	Maximum _{II} bei 3650 Å
G_4	Maximum _I bei 2550 Å,	Maximum _{II} bei 3600 Å

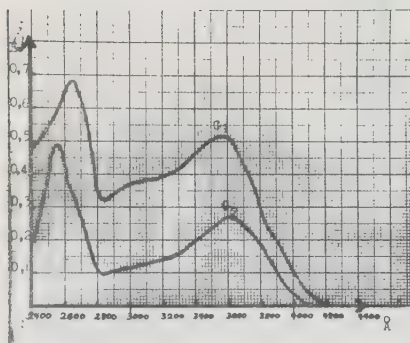


Abb. 3

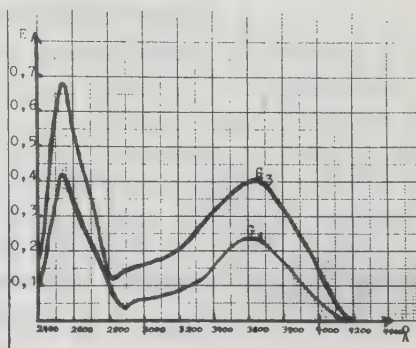


Abb. 4

14) HÖRHAMMER, L. u.

HÄNSEL, R.

15) HÖRHAMMER, L. u.

HÄNSEL, R.

Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz.
Ges. 284, 276 (1951)

Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz.
Ges. 287, 310 (1954)

Das kleinere Maximum hatten G_1 , G_2 , G_3 und G_4 bei der zweiten Bande, im längerwelligen Bereich. Auch das deutet auf eine Zuckerverknüpfung in C_3 -Stellung hin.

b) Hydrolyse von Eluaten der vier Flavonolglykoside und Identifizierung der Spaltstücke

Mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie wurden in großem Maße Eluate der vier Flavonolglykoside G_1 - G_4 hergestellt und diese mit Salzsäure hydrolysiert.

G_1 : Das Aglykon des Flavonolglykosids trennte sich in drei von H. GÖTZ¹⁶⁾ vorgeschlagenen Lösungsmittelsystemen nicht von authentischem Kämpferol, gab mit basischem Bleiacetat besprüht eine gelbe Farbe und wies in den drei Systemen folgende R_F -Werte auf:

Gemisch A: Eisessig-Wasser (6+4)	$R_F = 0,47$
Gemisch B: Wassergesättigtes Chloroform	$R_F = 0,20$
Gemisch C: Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)	$R_F = 0,38.$

Der Zuckeranteil erwies sich papierchromatographisch identisch mit authentischer Glukose in den Systemen:

Gemisch D: Äthylacetat-Pyridin-Wasser (5+2+5)	$R_F = 0,30$
Gemisch E: Butanol-Eisessig-Wasser (5+4+1)	$R_F = 0,20.$

G_1 war also ein Kämpferolglukosid und dürfte identisch mit dem von F. TUTIN²⁾ isolierten Kämpferin sein.

G_2 : Das Aglykon des Flavonolglykosids G_2 trennte sich in drei Lösungsmittelsystemen nicht von authentischem Isorhamnetin, gab mit basischem Bleiacetat die gleiche gelbe Farbtönung und hatte folgende R_F -Werte:

Gemisch A (siehe G_1)	$R_F = 0,44$
Gemisch B " "	$R_F = 0,18$
Gemisch C " "	$R_F = 0,33.$

16) GÖTZ, H. Dissertation, München 1957, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre
2) TUTIN, F. Proc. Chem. Soc. 278, 2006 (1913)

Als Zuckeranteil wurde wie bei G_1 Glukose identifiziert. G_2 stellt demnach ein Isorhamnetinglukosid dar.

G_3 : Das Aglykon des Flavonolglykosids G_3 trennte sich in drei Lösungsmittelsystemen nicht von authentischem Quercetin, gab mit basischem Bleiacetat die gleiche orange Farbe und hatte folgende R_F -Werte:

Gemisch A (siehe G_1):	$R_F = 0,33$
Gemisch B " " :	$R_F = 0,08$
Gemisch C " " :	$R_F = 0,25.$

Als Zuckeranteil wurde wie bei G_1 und G_2 Glukose gefunden. Bei G_3 handelt es sich um ein Quercetinglukosid.

G_4 : Das Aglykon des Flavonolglykosids G_4 trennte sich in drei Lösungsmittelsystemen nicht von authentischem Isorhamnetin, gab mit basischem Bleiacetat die gleiche gelbe Farbe und hatte folgende R_F -Werte:

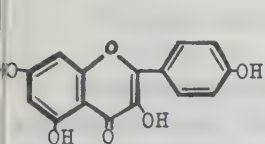
Gemisch A (siehe G_1):	$R_F = 0,44$
Gemisch B " " :	$R_F = 0,18$
Gemisch C " " :	$R_F = 0,33.$

Als Zuckeranteil wurde wie bei G_1 , G_2 und G_3 Glukose gefunden. G_4 war also wie G_2 ein Isorhamnetinglukosid.

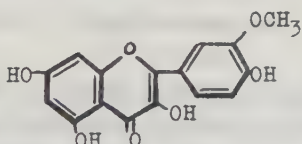
Wir nahmen auch die Absorptionsspektren der vier Aglykone auf und verglichen sie mit denen von authentischem Kämpferol, Isorhamnetin und Quercetin:

	Maximum _I	Maximum _{II}
Kämpferol	2670 Å	3680 Å
Aglykon von G_1	2670 Å	3680 Å
Isorhamnetin	2550 Å	3700 Å
Aglykone von G_2 und G_4	2550 Å	3700 Å
Quercetin	2580 Å	3750 Å
Aglykon von G_3	2580 Å	3750 Å

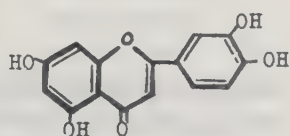
Bei den gefundenen Aglykonen handelt es sich um drei sehr ähnliche Flavonole, die sich nur durch eine OH- bzw. OCH₃-Gruppe voneinander unterscheiden. Das Auffinden von Quercetin in Gesellschaft mit Isorhamnetin steht in Übereinstimmung mit H. GÜTZ¹⁶⁾, der bei der Familie der Umbelliferen feststellte, daß Isorhamnetin immer zusammen mit Quercetin auftrat.



Kämpferol
(5,7,4'-Trioxyflavonol)



Isorhamnetin
(5,7,4'-Trioxy-3'-methoxyflavonol)



Quercetin
(5,7,3',4'-Tetraoxyflavonol)

Die Identifizierung des Aglykons von G₃ (= Quercetin) erklärt die beim Besprühen mit basischem Bleiacetat beim Glykosid G₃ aufgetretene orange Färbung. Nach T. B. GAGE, C. D. DOUGLAS und S. H. WENDER¹⁷⁾ kann eine solche nur eintreten, wenn sich in 3'- und 4'-Stellung des Flavonolmoleküls OH-Gruppen befinden; dies ist beim Quercetin der Fall. Keine von beiden OH-Gruppen des Glykosids G₃ kann also mit einem Zucker verknüpft sein.

c) Quantitative Hydrolyse der vier Flavonolglykoside

Der verhältnismäßig niedrige R_F-Wert der vier Flavonolglykoside deutete darauf hin, daß es sich nicht um Monoglukoside handeln konnte; auch F. TUTIN²⁾ hatte ja ein Kämpferoldiglukosid isoliert. Zur Klärung der Frage, wieviele Moleküle Glukose bei den einzelnen Glykosiden mit einem Molekül Aglykon verbunden waren, führten wir quantitative Hydrolysen durch (L. HÖRHAMMER, E. VORNDRAH und H. WAGNER¹⁸⁾).

17) GAGE, T. B., DOUGLAS, C.D.
u. WENDER, S. H.

Analytic. Chem. 22, 708 (1950);
ref.: PAECH, K. u. TRACEY M.V.,
Moderne Methoden der Pflanzen-
analyse, Band III, S. 468 (1955).
Proc.Chem.Soc. 278, 2006 (1913)
Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.
Ges. 289. 316 (1956)

2) TUTIN, F.
18) HÖRHAMMER, L. VORNDRAH, E.
u. WAGNER, H.

In je 2 ml der wäßrigen Eluate der Glykoside $G_1 - G_4$ wurden nach Hydrolyse der Aglykonanteil und die Glukose bestimmt. Dabei wurde der Aglykonanteil mit Hilfe eines zuvor festgelegten speziellen Extinktionskoeffizienten nach der für das LAMBERT-BEERsche Gesetz zutreffenden Formel:

$$\text{Konzentration } c = \frac{\text{Extinktion gemessen}}{\text{Extinktion spez.} \cdot \text{Dichte } d \text{ (cm)}} \cdot \frac{g}{l}$$

und die Konzentration des Zuckers nach der Anthronmethode mit Hilfe einer Eichkurve für Glukose ermittelt. Bei der Bestimmung der Glukose mußten rasch (in der Kälte) eluierte Lösungen der Flavonolglykoside Verwendung finden, da sonst die aus dem Papier herausgelösten Celluloseanteile zu hohe Blindwerte ergaben. Bei den Aglykonbestimmungen verwendeten wir dieselben Eluate. Für den Blindversuch versetzten wir die gleiche Gewichtsmenge Papier, aus der wir das betreffende Flavonolglykosid eluierten, die gleiche Zeit mit der gleichen Menge Wasser und entnahmen davon ebenfalls 2 ml für die Glukosebestimmung.

G_1 : Der spezielle Extinktionskoeffizient des Kämpferols beim Maximum 3680 Å wurde mit 67,0 ermittelt. Wir erhielten nach Hydrolyse von 2 ml Eluat (Gesamtvolumen der Lösung 10 ml) die Extinktion $E = 0,82$.

$$c = \frac{0,82}{67 \cdot 1 \text{ cm}} \cdot \frac{g}{l} = 0,122 \text{ mg Kämpferol in 2 ml.}$$

Bei der Zuckerbestimmung hatten 2 ml unseres Hydrolysates die Extinktion $E = 0,72$, der Blindwert war 0,13. Der Extinktionswert 0,59 entsprach nach der mit wasserfreier Glukose aufgestellten Eichkurve 0,147 mg Glukose.

Das Molekulargewicht des Kämpferols beträgt 286, das der Glukose 180. Nach Abzug des bei einer Glykosidbildung austretenden Wassers ($M = 18$) ergeben sich somit folgende theoretische Molekulargewichte für Kämpferolglukoside:

Monoglukosid	Diglukosid	Triglukosid
448	610	772

Da wir 0,122 mg Kämpferol ermittelt hatten, folgt:
 $286 : 448 : 610 : 772 = 0,122 \text{ mg} : x_1 : x_2 : x_3$

$$x_1 = 0,191 \text{ mg}; \quad x_2 = 0,260 \text{ mg}; \quad x_3 = 0,329 \text{ mg}.$$

Zieht man von diesen Werten die gefundene Menge des Aglykons ab, so erhält man für Kämpferolglukoside mit dem Aglykon 0,122 mg folgende Glukosemengen:

Monoglukosid	Diglukosid	Triglukosid
0,069 mg	0,138 mg	0,207 mg

Wir fanden 0,147 mg Glukose, somit handelt es sich wahrscheinlich um ein Diglukosid. Auch F. TUTIN²⁾ hatte auf andere Weise das Vorhandensein von zwei Glukosemolekülen bewiesen.

G₂: Da das Isorhamnetin die gleiche Anzahl von chromophoren OH-Gruppen in der gleichen Gruppierung wie das Kämpferol aufweist, benützten wir dessen speziellen Extinktionskoeffizienten für die quantitative Bestimmung. Für eine eigene Bestimmung stand nicht genügend Isorhamnetin zur Verfügung.

E_{spez.} des Isorhamnetins beim Maximum 3700 Å = 67,0.
 Nach Hydrolyse von 2 ml Eluat erhielten wir E = 0,86.

$$c = \frac{0,86}{67 \cdot 1 \text{ cm}} \cdot \frac{K}{1} = 0,128 \text{ mg Isorhamnetin in 2 ml.}$$

Bei der Zuckerbestimmung hatten 2 ml Hydrolysat nach Abzug des Blindwertes E = 0,53; für diesen Wert entnahmen wir aus der Eichkurve 0,128 mg Glukose.

Das Molekulargewicht des Isorhamnetins ist 316. Somit ergeben sich folgende theoretische Molekulargewichte für Isorhamnetin-glukoside:

Monoglukosid	Diglukosid	Triglukosid
478	640	802

2) TUTIN, F.

Proc. Chem. Soc. 278, 2006 (1913)

Wir hatten 0,128 mg Isorhamnetin ermittelt, somit ergibt sich:
 $316 : 478 : 640 : 802 = 0,128 \text{ mg} : x_1 : x_2 : x_3$
 $x_1 = 0,193 \text{ mg}; \quad x_2 = 0,258 \text{ mg}; \quad x_3 = 0,323 \text{ mg};$

Nach Subtraktion der gefundenen Menge des Aglykons von diesen Werten ergeben sich für Isorhamnetinglukoside mit dem Aglykon 0,128 mg folgende Glukosemengen:

Monoglukosid	Diglukosid	Triglukosid
0,065 mg	0,130 mg	0,195 mg

Da wir 0,128 mg Glukose fanden, handelt es sich wahrscheinlich um ein Diglukosid.

G₃: Der spezielle Extinktionskoeffizient für Quercetin beim Maximum 3750 Å beträgt 80,0¹⁹⁾. Nach Hydrolyse von 2 ml Eluat G₃ ergab sich E = 0,44.

$$c = \frac{0,44}{80 \cdot 1 \text{ cm}} \cdot \frac{E}{1} = 0,055 \text{ mg Quercetin in 2 ml Hydrolysat.}$$

Die Zuckerbestimmung lieferte für 2 ml Hydrolysat nach Abzug des Blindwertes eine Extinktion von E = 0,28; für diesen Wert ermittelten wir aus der Eichkurve 0,054 mg Glukose.

Für das Molekulargewicht des Quercetins M = 302 erhält man folgende theoretische Molekulargewichte von Quercetinglukosiden:

Monoglukosid	Diglukosid	Triglukosid
464	626	788

Für die gefundenen 0,055 mg Quercetin ergibt sich:

$$302 : 464 : 626 : 788 = 0,055 : x_1 : x_2 : x_3$$

$$x_1 = 0,084 \text{ mg}; \quad x_2 = 0,114 \text{ mg}; \quad x_3 = 0,143 \text{ mg}.$$

Nach Abziehen der ermittelten Aglykonmenge von diesen Werten erhält man für Quercetinglukoside mit dem Aglykon 0,055 mg folgende Glukosemengen:

Monoglukosid	Diglukosid	Triglukosid
0,029 mg	0,059 mg	0,088 mg

19) GRIFFITH, K.,
 KREWSON, Ch. u.
 NAGHSKI, J.

Rutin and Related Flavonoids,
 Easton/Pa. 1955

Es handelt sich wahrscheinlich um ein Diglukosid, da wir einen Wert von 0,055 mg Glukose erhalten hatten.

G₄: Der spezielle Extinktionskoeffizient von Isorhamneti. beträgt beim Maximum 3700 Å = 67,0 (siehe G₂).

Wir fanden nach Hydrolyse von 2 ml Eluat E = 0,48

$$c = \frac{0,48}{67 \cdot 1 \text{ cm}} \cdot \frac{E}{1} = 0,072 \text{ mg Isorhamnetin in 2 ml.}$$

2 ml Hydrolysat hatten bei der Zuckerbestimmung nach Abzug des Blindwertes eine Extinktion von 0,4; für diesen Wert entnahmen wir aus der Eichkurve 0,088 mg Glukose.

Das Molekulargewicht des Isorhamnetins beträgt 316. Somit sind die theoretischen Molekulargewichte für Isorhamnetinglukoside wie folgt:

Monoglukosid	Diglukosid	Triglukosid
478	540	802

Wir hatten 0,072 mg Isorhamnetin ermittelt, folglich ist

$$316 : 478 : 540 : 802 = 0,072 : x_1 : x_2 : x_3$$

$$x_1 = 0,110 \text{ mg}; \quad x_2 = 0,146 \text{ mg}; \quad x_3 = 0,182 \text{ mg}.$$

Subtrahiert man von diesen Werten die gefundene Menge des Aglykons, so ergeben sich für Isorhamnetinglukoside mit dem Aglykon 0,072 mg folgende Glukosemengen:

Monoglukosid	Diglukosid	Triglukosid
0,038 mg	0,074 mg	0,110 mg

Wir fanden 0,088 mg Glukose, auch hier handelt es sich wahrscheinlich um ein Diglukosid.

Bei allen vier Flavonolglykosiden trafen nach diesen Ergebnissen zwei Moleküle Glukose auf ein Molekül Aglykon. Der Zirkon-Zitronensäure-Test hatte ergeben, daß mindestens ein Molekül Glukose in C₃-Stellung verknüpft sein muß, eine zusammen mit C₇-Stellung bevorzugte Verknüpfungsstelle in der Natur. Durch das Fehlen kristalliner Substanzen war die Aufklärung der Lage des zweiten Glukosemoleküls nicht möglich. Hier muß jedoch ein

Unterschied zwischen den Glykosiden G_2 und G_4 bestehen, da beide aus Isorhamnetin und 2 Molekülen Glukose zusammengesetzt sind und die verschiedenen R_F -Werte sonst nicht zu erklären sind. Möglicherweise ist bei G_4 auch das zweite Glukosemolekül in C_3 -Stellung verknüpft, die Substanz hätte somit eine freie OH-Gruppe mehr und der niedrigere R_F -Wert gegenüber G_2 wäre so erklärbar.

4. Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung der Flavonolglykoside von Folia Sennae

Im Hinblick auf die pharmakologischen Versuche schien es wünschenswert, Anhaltspunkte über die ungefähre Menge zu gewinnen, in der die aufgefundenen Flavonolglykoside in der Droge vorkommen. Im pharmakologischen Test wäre es dann möglich, die Anthranolglykoside in der Menge mit Flavonolen zu kombinieren, wie sie in der Droge tatsächlich vorliegen.

Dazu extrahierten wir 10 g Folia Sennae pulv. sub. bis zur völligen Farblosigkeit des abfließenden Äthanols in einer Papierhülse im Soxhlet. Aus dem äthanolischen Extrakt wurde die größte Menge an Ballaststoffen abgetrennt, diese auf Einschluß von Flavonolen geprüft und der die Flavonolglykoside enthaltende Rückstand in genau 100 ml Äthanol aufgenommen. Auf mehrere Chromatogramme wurde davon 1 ml (entsprechend 100 mg Droge) als Streifen aufgetragen, nach dem Entwickeln die vier Flavonolglykoside eluiert und deren Konzentration in den Eluaten spektrophotometrisch bestimmt. Die Bestimmung geschah auf zwei verschiedenen Wegen. Wir ermittelten einmal nach der Hydrolyse die Konzentration der Aglykone mit Hilfe ihrer speziellen Extinktionskoeffizienten und rechneten anschließend auf Diglukoside um. In der anderen Bestimmung nahmen wir den speziellen Extinktionskoeffizienten der Diglukoside bei der zweiten Bande nach L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und R. LUCK²⁰⁾ mit 20-30 an. Für die Glykoside, die als Aglykon Kämpferol und Isorhamnetin mit je vier chromophoren OH-Gruppen besitzen, setzten wir $E_{\text{spez.}} = 25$;

20) HÖRHAMMER, L., Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz.
WAGNER, H. u. LUCK, R. Ges. 289, 613 (1956)

für das Quercetindiglukosid $E_{\text{spez.}} = 32$ analog Rutin nach K. GRIFFITH und Mitarbeitern¹⁹⁾, da sich nach F. C. CHEN und C. H. LIN²¹⁾ das Quercetin infolge einer zusätzlichen OH-Gruppe hyperchromer verhält. Nach der Formel

$$c = \frac{E_{\text{gemessen}}}{E_{\text{speziell}} \cdot d \text{ (cm)}} \cdot \frac{g}{l}$$

konnten wir somit auch auf diesem Wege die ungefähre Konzentration der Flavonolglykoside bestimmen und beide Methoden miteinander vergleichen. Das quantitative Eluat der jeweiligen Substanz wurde auf 10 ml H₂O eingeeengt.

G₁: Nach quantitativer Eluierung der 100 mg Droge entsprechenden Chromatogrammzonen erhielten wir folgende Extinktionswerte:

1. E = 0,910
2. E = 0,925 Mittelwert: E = 0,925
3. E = 0,940

Somit ist

$$c = \frac{0,925}{25 \cdot 1 \text{ cm}} = 0,037 \text{ g/l;}$$

d.h. in 10 ml Eluat befanden sich 0,37 mg. Da wir von 100 mg Droge ausgingen, enthielt diese also 0,37 mg% Glykosid G₁.

Nach der Hydrolyse, wobei zu dem in 7 ml Äthanol gelösten Eluatrückstand von 0,1 g Droge 3 ml n/1 HCl gegeben wurden, ergaben sich folgende Extinktionswerte: 0,96; 1,01; 1,03; Mittelwert: 1,0.

$$c = \frac{1,0}{67 \cdot 1 \text{ cm}} = 0,015 \text{ g/l;}$$

d.h. in den 10 ml war der hundertste Teil davon enthalten = 0,15 mg% Kämpferol. Nach dem Molekulargewicht des Kämpferols (M = 286) und der Glukose (M = 180) ist das Verhältnis des Aglykons zum Glykosid 286 : 646 = 0,15 : x; x = 0,33.

Nach dieser Bestimmung enthielt die Droge somit 0,33 mg% Kämpferoldiglukosid.

19) GRIFFITH, K., KREWSON, Rutin and Related Flavonoids, Ch. u. NAGHSKI, J. Easton/Pa. 1955

21) CHEN, F. C. u. LIN, C. H. J. Formosan Sci. 6, 81 (1952)

G₂: Die quantitative Eluierung der 100 mg Droge entsprechenden Chromatogrammzonen ergab folgende Extinktionswerte:

1. E = 0,610
2. E = 0,635 Mittelwert: 0,625
3. E = 0,630

Somit ist

$$c = \frac{0,625}{25 \cdot 1 \text{ cm}} = 0,025 \frac{\text{g}}{\text{l}} ;$$

d.h. in 10 ml Eluat befanden sich 0,25 mg. Da wir von 100 mg Droge ausgingen, enthielt diese also 0,25 mg% Glykosid G₂.

Wir ermittelten E nach der Hydrolyse mit 0,86; 0,90 und 0,91. Mittelwert: E = 0,89.

$$c = \frac{0,89}{67 \cdot 1 \text{ cm}} = 0,0133 \frac{\text{g}}{\text{l}} ;$$

d.h. in den 10 ml war der hundertste Teil davon enthalten = 0,13 mg% Isorhamnetin. Durch das Molekulargewicht des Isorhamnetins (M = 316) ist das Verhältnis des Aglykons zum Glykosid 316 : 676 = 0,133 : x; x = 0,28. Nach dieser Bestimmung enthielt die Droge somit 0,28 mg% Isorhamnetindiglukosid.

G₃: Die quantitative Eluierung der 100 mg Droge entsprechenden Chromatogrammzonen lieferte folgende Extinktionswerte:

1. E = 0,45
2. E = 0,49 Mittelwert: E = 0,48
3. E = 0,52

Somit ist

$$c = \frac{0,48}{32 \cdot 1 \text{ cm}} = 0,015 \frac{\text{g}}{\text{l}} ,$$

d.h. in 10 ml Eluat befanden sich 0,15 mg. Da wir von 100 mg Droge ausgingen, enthielt diese also 0,15 mg% Glykosid G₃.

Nach der Hydrolyse (siehe G₁) ergaben sich: E = 0,52; 0,54; 0,55. Mittelwert: E = 0,54.

$$c = \frac{0,54}{80 \cdot 1 \text{ cm}} = 0,0067 \frac{\text{g}}{\text{l}} ;$$

d.h. in den 10 ml war der hundertste Teil davon enthalten = 0,067 mg% Quercetin.

Das Verhältnis Aglykon zu Glykosid ist hier $302 : 666 = 0,067 : x$; $x = 0,147$. Nach dieser Bestimmung enthielt die Droge somit $0,147 \text{ mg\%}$ Quercetindiglukosid.

G₄: Die quantitative Eluierung der 100 mg Droge entsprechenden Chromatogrammzonen lieferte folgende Extinktionswerte:

1. $E = 0,42$

2. $E = 0,44$

Mittelwert: $E = 0,45$

3. $E = 0,47$

Somit ist

$$c = \frac{0,45}{25 \cdot 1 \text{ cm}} = 0,018 \frac{\text{g}}{\text{l}} ;$$

d.h. in 10 ml Eluat fand sich $0,18 \text{ mg G}_4$. Die Droge enthielt also $0,18 \text{ mg\%}$ dieses Glykosids.

Die Hydrolyse (siehe G₁) ergab $E = 0,52$; $0,57$ und $0,59$; Mittelwert: $E = 0,56$.

$$c = \frac{0,56}{67 \cdot 1 \text{ cm}} = 0,0084 \frac{\text{g}}{\text{l}} ;$$

d.h. in den 10 ml war der hundertste Teil davon enthalten = $0,084 \text{ mg\%}$ Isorhamnetin. Das Verhältnis Aglykon zu Glykosid ist hier wiederum wie bei G₂ $316 : 676 = 0,84 : x$; $x = 0,18$. Auch nach dieser Bestimmung enthielt die Droge somit $0,18 \text{ mg\% G}_4$ (Isorhamnetindiglukosid).

Beide Methoden ergaben in mehreren Versuchen ziemlich übereinstimmende Werte. Somit lagen die vier Flavonolglykoside in der Droge in etwa folgender Konzentration vor:

G₁ (Kämpferoldiglukosid) = $0,37 \%$

G₂ (Isorhamnetindiglukosid) = $0,25 \%$

G₃ (Quercetindiglukosid) = $0,15 \%$

G₄ (Isorhamnetindiglukosid) = $\frac{0,18 \text{ \%}}{0,95 \text{ \%}}$

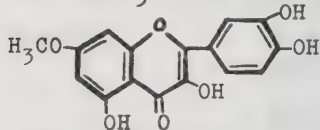
Zusammen lagen die vier Flavonolglykoside also in etwa 1%iger Menge in der Droge vor.

5. Bestimmung des Anthranolglykosidgehaltes unserer Droge

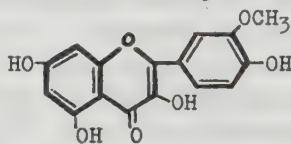
Für unsere pharmakologische Versuche war es von Wichtigkeit, auch den Gehalt an Anthranolglykosiden und den "Emodin-gehalt" der Folia Sennae festzustellen. Wir arbeiteten in 3 Bestimmungen nach der Methode von H. AUTERHOFF²²⁾ und fanden im Mittel 2,9% Sennoside und 0,4% Emodinkörper. Demnach waren also Sennoside und Flavonolglykoside etwa im Verhältnis von 3 : 1 in unserer Droge enthalten, eine für die pharmakologischen Versuche wichtige Tatsache. Auch H. AUTERHOFF²²⁾ und J. W. FAIRBAIRN und M. R. I. SALEH¹⁰⁾ hatten Sennosidwerte von durchschnittlich 3% erhalten.

6. Beschaffung und Isolierung weitgehend ähnlicher Flavonol-Substanzen für die pharmakologischen Versuche

Nachdem wir ein Quercetindiglukosid in den Folia Sennae aufgefunden hatten, war es naheliegend, Rutin (Merck), ein Quercetin-rhamnoglukosid für die pharmakologischen Versuche zu benutzen; Quercetin als Aglykon bezogen wir von der Firma Schuchardt, München. Isorhamnetinglukoside und auch das Aglykon Isorhamnetin waren weder im Handel zu erhalten noch aus Drogen herzustellen. Dagegen erhielten wir von der Firma Fluka, Basel, das Aglykon Rhamnetin. Der Unterschied gegenüber Isorhamnetin ist der, daß Rhamnetin die OCH₃-Gruppe am C₇-Atom statt am C₃-Atom trägt.



Rhamnetin



Isorhamnetin

22) AUTERHOFF, H.

Arzneimittel-Forsch. 1, 412 (1951)

10) FAIRBAIRN, J. W. u.
SALEH, M. R. I.

J. Pharmacy Pharmacol. 3, 93 u. 918
(1951)

T. FUKUDA³⁾ hatte speziell von der Abführwirkung eines Kämpferolglykosids berichtet. Deshalb schien es uns ratsam, ein Kämpferolglykosid aus einer anderen Pflanze zu isolieren. Dabei konnte gleichzeitig ein Teil des Glykosids zum Aglykon hydrolysiert werden, dessen Wirkung wir ebenfalls untersuchen wollten. Wir wählten die Blüten der Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum* L.), aus denen H. J. GEHRMANN²³⁾ in verhältnismäßig hoher Ausbeute das Hauptglykosid Kämpferol-3-monoglukosid isoliert hatte. Die Ausbeute der Isolierung war bei uns geringer; wir erhielten aus 7 kg getrockneten Kastanienblüten 1,5 g reines Kämpferol-3-monoglukosid. Möglicherweise waren 1955 - im Jahre des Isolierungsversuches - in geringerem Maße Flavonolkörper in den Kastanienblüten enthalten als in den von H. J. GEHRMANN 1953 und 1954 untersuchten Drogen.

Zwei weitere Gramm Kämpferol-3-glukosid^{*)} benützten wir zur Hydrolyse und stellten daraus 0,8 g Kämpferol-Aglykon her.

Für die pharmakologische Prüfung standen uns folgende, den Sennaflavonolen ähnliche Substanzen zur Verfügung:

Rutin, Quercetin, Rhamnetin in beliebiger Menge,
1,5 g Kämpferol-3-glukosid und 0,8 g Kämpferol.

Da die Möglichkeit bestand, daß erst ein Synergismus unter den vier Glykosiden die Abführwirkung der Anthrachinonderivate verstärkte, wurden nach schon beschriebenem Verfahren die vier Glykoside zusammen in größerem Maßstabe eluiert. Nach Abschluß dieser Arbeit standen uns außerdem 200 ml einer wäßrigen Lösung zur Verfügung, die laut spektrophotometrischer Messung (Mittelwert der speziellen Extinktionskoeffizienten) ca. 200 mg Sennaflavonolglykoside enthielt. Auch diese Lösung konnte nunmehr mit den Sennosiden kombiniert werden.

3) FUKUDA, T. Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 164, 685 (1932)

23) GEHRMANN, H. J. Dissertation, München 1955, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre

*) Fräulein Dr. L. Endres, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre München, stellte uns liebenswürdigerweise diese Menge dieses Glykosids zur Verfügung.

7. Folliculi Sennae

Neben den Folia Sennae Tinnevelly wurden auch die Folliculi Sennae Tinnevelly papierchromatographisch untersucht. In gleichen Laufhöhen enthielten die Chromatogramme der Folliculi Sennae die gleichen Flavonolflecken wie die der Folia Sennae. Es ist mit großer Sicherheit anzunehmen, daß auch die Senneschoten die gleichen Flavonolglykoside enthalten. Ein Unterschied dürfte darin zu sehen sein, daß das mit Bleiacetat braunorange gefärbte Quercetindiglukosid in den Folliculi Sennae in größerer Menge vorzukommen scheint.

C. Experimenteller Teil

1. Herkunft der Drogen

Nur Extraktion gelangten Sennesblätter und Senneschoten der Firma Unfried, München, in ganzem, feingeschnittenem oder feinst gepulvertem Zustand.

2. Aufarbeitung der Drogen

Jeweils 250 g Droge wurden im Soxhlet mit Äthanol extrahiert bis das übergehende Lösungsmittel fast farblos war. Bei der quantitativen Bestimmung zogen wir 10 g feinst gepulverte Droge in einer Papierextraktionshülse bis zur völligen Farblosigkeit etwa 70 Stunden aus. Die Prüfung auf Flavonole mit 1%iger äthanolischer Aluminiumchloridlösung ergab keine Farbvertiefung mehr.

Bei Auszügen mit Amylalkohol extrahierten wir 250 g Droge mit 1 l Lösungsmittel über Nacht im Schüttelapparat.

Äthanol oder Amylalkohol wurden im Vakuum abgedampft und der Rückstand in heißem Wasser aufgenommen. Von dem nicht mehr löslichen Chlorophyll filtrierten wir ab und entfernten den Rest durch nochmaliges Eindampfen, Aufnehmen in Wasser und anschließendes Filtrieren. Die so gewonnenen wäßrigen Auszüge dampften wir zur Trockene ein und lösten diese wiederum in Äthanol. Von den ausgeschiedenen kleineren Mengen flavonolfreier Ballaststoffe wurde abfiltriert. Das Filtrat, das gegebenenfalls noch mit Petroläther oder Chloroform ausgeschüttelt wurde, bildete die Lösung, die wir zur papierchromatographischen Identifizierung und zur Eluierung auf Papierchromatographierpapier nach weitgehendem Einengen auftrugen. Mit diesen Lösungen wurden auch die nicht erfolgreichen Kristallisationsversuche angestellt. Bei diesen fanden Gemische von Wasser mit Aceton, Methanol, Äthanol, Äther und Essigester in wechselnder Konzentration Verwendung.

3. Papierchromatographie

a) Chromatographische Arbeitsmethoden

Wir arbeiteten nach der aufsteigenden und absteigenden eindimensionalen Methode, wobei wir letztere bevorzugten. Wir verwendeten halbe Bögen Chromatographierpapier und trugen die Substanzen im Abstand von 3 cm, 6 cm vom unteren Rand des Papiers entfernt, auf.

Nach dem Entwickeln, das im Falle der Eluierung fortgesetzt wurde, bis sich das oberste Glykosid G_1 bis auf wenige cm dem oberen Papierrand genähert hatte, trockneten wir die Chromatogramme im warmen Luftstrom von 50° C. Anschließend wurden sie entweder zur Identifizierung mit verschiedenen Reagenzien besprüht oder die Zonen unbesprüht unter der UV-Lampe markiert, ausgeschnitten und eluiert.

Zur Eluierung trugen wir die Substanzen nicht punktförmig, sondern in einem etwa 1 cm breiten Streifen, zehnmal nacheinander auf. Das eigentliche Eluieren geschah in unserem Falle mit destilliertem warmem Wasser, das die vier hydrophilen Flavonolglykoside optimal aus der Cellulose herauslöste. Nach dem Eindampfen der Eluate lösten wir die Rückstände in Äthanol und filtrierten Cellulosefäserchen ab. Die so gewonnenen Äthanolösungen dienten zur Spektrophotometrie, zur Papierchromatographie, zu Farbreaktionen und zur Hydrolyse.

Zur quantitativen Bestimmung der Flavonolglykoside in den Folia Sennae eluierten wir die ausgeschnittenen Glykosidzonen so lange mit warmem H_2O bis dieses mit $AlCl_3$ -Lösung keine Farbvertiefung mehr gab, d.h. keine Flavonole mehr im Papier enthalten waren.

b) Papier

Wir arbeiteten stets mit der gleichen Papiersorte, dem Chromatographierpapier der Firma Schleicher & Schüll Nr. 2043b Gl., das sich für unsere Untersuchungen bestens bewährte. Als Laufrichtung diente die durch einen Wasserzeichenpfeil angege-

bene größte Fließgeschwindigkeitsstrecke. Für Eluierungen benützten wir das gleiche Papier gewaschen; bei Verwendung so präparierter Papiere konnten die getrennten Substanzen vollständig aus der Cellulose herausgelöst werden.

c) Lösungsmittel

Zur Kontrolle der Extrakte auf Anwesenheit von Flavonolkörpern diente ursprünglich das Gemisch Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3). Verwendet wurde die Oberphase, Sättigung der Kammer mit der wäßrigen Unterphase, Laufzeit je nach Temperatur 5 - 8 Stunden. Für die Auftrennung der Glykoside und zum Entwickeln der Streifenchromatogramme benutzten wir n-Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5), Laufzeit 20 - 24 Stunden, Sättigung der Kammer mit der wäßrigen Unterphase.

Zum Nachweis der Aglykone dienten 3 Gemische:

1. Wassergesättigtes Chloroform, Laufzeit 6 - 8 Stunden;
2. Eisessig-Wasser (6+4), Laufzeit 20 Stunden;
3. Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5), Laufzeit 8 - 10 Stunden.

Die Zucker (wir fanden nur Glukose) identifizierten wir in den Systemen Äthylazetat-Pyridin-Wasser (5+2+5), Oberphase, aufsteigend, Laufzeit 12 Stunden und Butanol-Eisessig-Wasser (siehe oben). Spuren von nachgewiesener Xylose erwiesen sich als von unter gleichen Bedingungen eluiertem Papier stammend.

d) Farbreaktionen.

Die Flavonolkörper enthaltenden Chromatogramme wurden mit folgenden Reagenzien besprüht und anschließend getrocknet:

1. 1%ige äthanolische $AlCl_3$ -Lösung. Mit diesem Reagens fluoreszierten die Flavonol-3-glukoside unter der UV-Lampe leuchtend gelb, die Aglykone gelbgrün.
2. 2%ige methanolische Zirkonoxychloridlösung. Die Substanzen verhielten sich wie beim Besprühen mit Aluminiumchloridlösung.
3. 3%ige wäßrige basische Bleiazetatlösung. Hier trat beim Vorhandensein von freien OH-Gruppen in 3'- und 4'-Stellung des Seitenphenyls unter der UV-Lampe eine orange Fluoreszenz auf

(Quercetin und dessen Glykoside). War diese Gruppierung nicht vorhanden, fluoreszierten die Flavonolflecke gelb oder gelbgrün.

Zum Entwickeln der Zucker auf dem Chromatogramm wurden diese mit Anilinphthalatlösung besprüht (1,66 g o-Phthalsäure und 0,93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst). Dabei fluoreszierten im UV-Licht Hexosen braungelb und Pentosen mehr rötlich (10 Minuten bei 110° C trocknen).

4. Hydrolyse und Neutralisierung der Hydrolysate

a) Hydrolyse der eluierten Lösungen der Flavonolglykoside G₁-G₄

Die Hydrolyse der äthanolischen Eluate erfolgte 2 Stunden lang am Rückflußkühler mit einigen ml n/1 HCl. Nach dieser Zeit waren alle vier Glykoside gespalten. Das Hydrolysat wurde nach dem Erkalten zunächst zur Abtrennung etwa ausgeschiedener Ballaststoffe filtriert und anschließend mit 3mal 20 ml Äthylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Äthylacetatausschüttelungen schüttelten wir mit Wasser zurück bis sie einen p_H von etwa 5 aufwiesen (Indikatorpapier Merck). Sie wurden auf wenige ml eingeeengt und dann zur Identifizierung der Aglykone chromatographiert oder spektrophotometriert.

Die salzsaure wäßrige Lösung neutralisierten wir mit dem stark basischen Anionenaustauscher Dowex 2^{*)}. Hierbei wurde das Harz zuvor mit Wasser, n/1 Natronlauge und n/1 Salzsäure gereinigt. Die Neutralisation und Regenerierung des Harzes erfolgte mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung in 70%igem Äthanol. Schließlich wurde noch mit reinem Äthanol nachgewaschen. Die auf dem Wasserbad auf wenige ml eingeengte salzsaure Lösung gaben wir langsam auf das in einer Bürette befindliche Harz und prüften die tropfenweise abfließende Lösung auf ihren p_H. Ein p_H 5 genügte, um die nochmals eingedampfte Zuckerlösung chromatographieren zu können.

b) Hydrolyse von Kämpferol-3-monoglukosid

In einem geräumigen Kolben wurden 2 g Kämpferolglykosid in warmem Aceton gelöst und mit 20 ml 2n HCl 2 Stunden lang auf

^{*)} Serva Entwicklungslaboratorium Heidelberg

dem siedenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Das Hydrolysat wurde mit einem Gemisch Äther + Essigester (1+1) bis zur Farblosigkeit ausgeschüttelt und die vereinigten Ausschüttelungen mit Wasser so lange zurückgeschüttelt bis die Oberphase wiederum einen p_H von 5 aufwies. Den Essigester dampften wir weitgehend ab und versetzten mit dem doppelten Volumen von 60%igem Äthanol. Am nächsten Tag wurde der entstandene Niederschlag abgenutscht und aus Essigester-Äthanol-Wasser-Gemisch umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 0,8 g Kämpferol vom Schmelzpunkt 270°C (reines Kämpferol Schmelzpunkt $272-274^{\circ} \text{C}$).

5. Spektrophotometrische Messungen

Die Spektren der Eluate der vier Glykosidzonen und die Spektren der Aglykone nahmen wir im Absorptionsspektralphotometer PMQ II (Zeiß), Monochromator M4 Q2 in Quarzküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) auf. Hierzu wurden die Lösungen jeweils so verdünnt, daß die Maxima im Bereich einer Extinktion von 0,5 bis 1,0 lagen (siehe S. 10).

Für quantitative Messungen arbeiteten wir bei der entsprechenden Wellenlänge der zweiten Bande (längerwelliger Bereich).

6. Quantitative Bestimmung der Glukose

2 ml Zuckerlösung wurden mit 4 ml Anthronreagens (0,2 g Anthron auf 100 ml konz. H_2SO_4) versetzt und nach dem Erkalten der Mischung die Extinktion bei $6200 \text{ \AA}$ spektrophotometrisch bestimmt. Auf einer auf wasserfreie Glukose (Glukosehydrat: wasserfreie Glukose = 98 : 90) berechneten Eichkurve entnahmen wir sodann die entsprechenden Glukosewerte (Abb. 5).

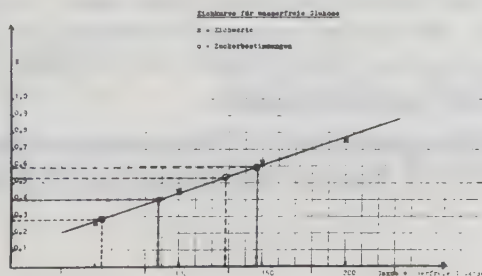


Abb. 5

7. Bestimmung des speziellen Extinktionskoeffizienten von Kämpferol

Schmelzpunktreines Kämpferol trockneten wir bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz und lösten davon 10,38 mg in 100 ml Äthanol. Von dieser Lösung wurde 1 ml entnommen, mit 3 ml n/1 HCl versetzt und ad 10 ml mit Äthanol aufgefüllt (gleiche Bedingungen wie bei der quantitativen Hydrolyse). In diesen 10 ml waren somit 0,1038 mg Kämpferol gelöst. Die Extinktion bei der zweiten Bande des Kämpferols betrug 0,695.

Nach der Formel

$$c = \frac{E_{\text{gem.}}}{E_{\text{spez.}} \cdot d} \quad \text{g/l}$$

ergab sich $E_{\text{spez.}} = E_{\text{gem.}} : c \cdot d = 0,695 : 0,01038 \text{ g/l};$

$E_{\text{spez.}} = 67.$

Der spezielle Extinktionskoeffizient von Kämpferol war demnach 67,0.

8. Zirkon-Zitronensäure-Test

Den Zirkon-Zitronensäure-Test führten wir mit den eluierten Lösungen durch. 2 ml Eluat wurden mit 2 ml einer 2%igen methanolischen Zirkonoxychloridlösung versetzt. Es trat gelbe Fluoreszenz auf. Nach Zugabe von 3 ml 5%iger wässriger Zitronensäurelösung verschwand die gelbe Farbe, trat jedoch beim Kochen mit 3 ml n/1 HCl wieder auf. Dies war bei allen vier eluierten Lösungen der Glykoside G_1 , G_2 , G_3 und G_4 der Fall. Es lagen somit sämtlich Glykoside mit einer durch Zuckerbindung besetzten OH-Gruppe am C_3 -Atom vor.

9. Isolierung von Kämpferol-3-glukosid aus Kastanienblüten

Wir gingen von 7 kg weißen Kastanienblüten aus. 3 kg davon wurden im April und Mai 1955 selbst gesammelt (München und Umgebung), 4 kg bezogen wir von der Firma Gagstetter, Nürnberg. Auch diese waren im selben Jahr gesammelt worden.

Da keine Extraktionsapparaturen in entsprechender Größe zur Verfügung standen, wurde die Droge im Perkulator mit 30 l Methanol

nach H. J. GEHRMANN²³⁾ extrahiert und ausgepreßt. Im Vakuum-
umlaufverdampfer^{*)} wurde der Methylalkohol abgedampft. Es blieb
ein zähflüssiger Rückstand zurück, den wir in heißem Wasser
lösten und einige Stunden auf dem Wasserbad erhitzen. Nach dem
Erkalten wurde von großen Mengen von abgeschiedenem Chlorophyll
und von Ballaststoffen abfiltriert. Der nochmals gereinigte Ex-
trakt wurde mit Äthylacetat ausgeschüttelt, die Ausschüttelungen
waren jedoch immer noch sehr stark verunreinigt. Wir gingen des-
halb dazu über, wiederholt die vereinigten Ausschüttelungen abzu-
dampfen, in Wasser aufzunehmen und von neuem mit Äthylacetat aus-
zuschütteln; dies dürfte mit Verlusten von Flavonolen verbunden
gewesen sein. Jedenfalls erhielten wir nach Umkristallisieren
der Mischkristalle die verhältnismäßig geringe Ausbeute von 1,5 g
Kämpferol-3-glukosid.

23) GEHRMANN, H. J.

Dissertation, München 1955, Institut für
Pharmazeutische Arzneimittellehre

*) Der Firma Heinrich Unfried danken wir für die lebenswürdige
Überlassung dieser Apparaturen und für die Bereitstellung
von 30 Litern Methanol.

D. Zusammenfassung der chemischen Untersuchungen

Die eingehende Untersuchung der bisher bekannten flavonolischen Bestandteile der Sennesblätter ergab keine kristallinen Substanzen.

Es gelang, auf papierchromatographischem und spektrophotometrischem Wege vier Flavonolglykoside zu identifizieren:

- | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 1) <u>Glykosid</u> G ₁ | Aglykon <u>Kämpferol</u> | Zuckeranteil <u>Glukose</u> | (2 Mol. |
| 2) <u>Glykosid</u> G ₂ | Aglykon <u>Isorhamnetin</u> | " <u>Glukose</u> | " |
| 3) <u>Glykosid</u> G ₃ | Aglykon <u>Quercetin</u> | " <u>Glukose</u> | " |
| 4) <u>Glykosid</u> G ₄ | Aglykon <u>Isorhamnetin</u> | " <u>Glukose</u> | " |

Bei dem Versuch, die Menge der in den Folia Sennae enthaltenen Flavonolglykoside zu bestimmen, erhielten wir als Resultat etwa 1%. Die gleichzeitig bestimmten Anthranolglykoside lagen zu 3% in der Droge vor.

Für die pharmakologischen Versuche war es wesentlich, gleiche oder zumindest weitgehend ähnliche Substanzen zu verwenden. Neben Stoffen, die wir aus dem Handel beziehen konnten, isolierten wir zusätzlich ein Kämpferolglukosid aus Kastanienblüten. Außerdem stellten wir uns mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie Gesamteluate der Sennaflavonolglykoside, G₁ - G₄, her, die wir ebenfalls zur pharmakologischen Testung verwendeten.

III. Pharmakologischer Teil

Bisherige Arbeiten und Theorien über die Abführwirkung der Sennesblätter und der Flavonole

Die Sennesblätter

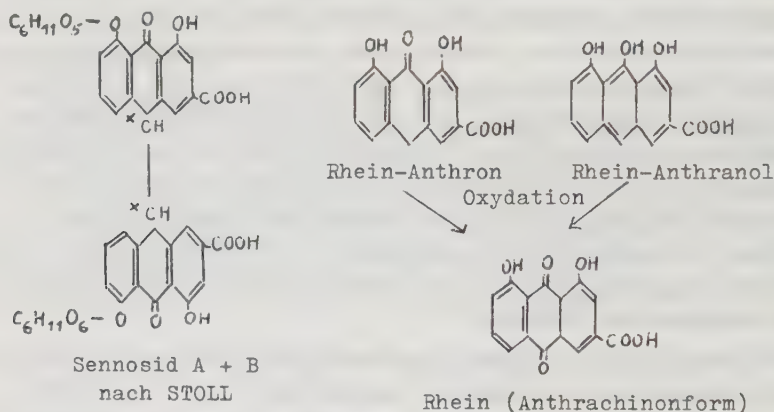
Die Folia Sennae gehören einer Gruppe von Drogen an, die wie Aloe, Rhizoma Rhei, Cortex Frangulae und Cascara Sagrada durch gemeinsamen Gehalt an Anthrachinonderivaten ausgezeichnet sind. Ursprünglich glaubte man²⁴⁾, die Abführwirkung dieser Drogen beruhe ganz allgemein auf den Anthrachinonen oder ihren Derivaten.

Nähere Kenntnisse über die Inhaltsstoffe der Sennesblätter ermittelten uns erst W. STRAUB und H. GEBHARDT²⁵⁾. Sie fanden zwei Glykoside und stellten fest, daß das Genin der Glykoside nicht das Anthrachinon ist, sondern daß ursprünglich ein Anthraglykosid vorliegt, aus dem erst nach Hydrolyse und durch Oxidation Anthrachinon entsteht. Die eine Glykosidart bezeichneten diese Autoren als einheitlich kristallisierbar, schwer zu hydrolysieren, 50 bis 60% der Wirksamkeit enthaltend und sowohl wasser- als auch methanollöslich. Die andere nur wasserlösliche Glykosidart hatte nur 20% der Wirksamkeit; sie sollte in den Blättern zu 1% enthalten sein und verhältnismäßig stärker wirken als das erstgenannte Glykosid.

Die endgültige Aufklärung der wirksamen Hauptinhaltsstoffe der Folia Sennae erfolgte erst in neuerer Zeit durch A. STOLL und seine Mitarbeiter W. KUSSMAUL, B. BECKER und A. HELFENSTEIN¹¹⁾.

- | | |
|---|---|
| 4) MADAUS, G. | Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Leipzig 1938, Abt. I, Heilpflanzen, Band I, S. 214 |
| 5) STRAUB, W. u. GEBHARDT, H. | Arch. exp. Pathol. Pharmacol. <u>181</u> , 399 (1936) |
| 1) STOLL, A., KUSSMAUL, W., BECKER, B. u. HELFENSTEIN, A. | a) Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 235 (1941)
b) Helv. chim. Acta <u>30</u> , 59 (1947)
c) Helv. chim. Acta <u>32</u> , 1892 (1949)
d) Helv. chim. Acta <u>33</u> , 313 (1950) |

Die isomeren Glykoside Sennosid A und B wurden isoliert, die Struktur aufgeklärt und durch Partialsynthese bewiesen. Es handelt sich um bimolekulare Glykoside, deren Zuckeranteile Glukose und deren Genine Sennidin A bzw. Sennidin B sind. Beide Aglykone bestehen aus zwei Molekülen Rheinanthron. Das Anthron ist die reduzierte Form des Anthrachinons, das auch in seine Enolform, das Anthranol übergehen kann. Der Unterschied zwischen beiden Glykosiden beruht in der sterischen Konfiguration, da das Molekül zwei asymmetrische C-Atome enthält. Sennosid A ist rechtsdrehend, Sennosid B stellt die intramolekular kompensierte Mesoform dar. Während Sennosid A sowohl alkohol- als auch wasserlöslich ist, ist Sennosid B nur wasserlöslich.



Die pharmakologische Wirkung der Anthrachinonderivate und damit auch der Sennoside (Sennosid A und B sind zu gleichen Teilen als "Pursennid (R)", 1 Dragée 12 mg Sennoside, im Arzneihandel) erstreckt sich auf den Dickdarm. 6 bis 12 Stunden nach der oralen Verabreichung von 1 bis 2 Dragées (= 12 bis 24 mg Sennoside) kommt es beim Menschen zu weichen oder auch schleimig-dünn flüssigen Stühlen. Wirkungsorte sind die Darmwand bzw. nach W. STRAUB und E. TRIENDL²⁶⁾ der darin befindliche AUERBACH'sche Nerven-Plexus. Die Förderung der perististischen Bewegungen erfolgt

26) STRAUB, W. u.
TRIENDL, E.

Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 185,
1 (1937)

nach W. HENDERSON²⁷⁾ indirekt durch Hemmung der antiperistaltischen Wellen. Die Folge ist eine Beschleunigung der Darmpassage der Ingesta und eine Herabsetzung der Wasser-Rückresorption im Dickdarm. Gleichzeitig kommt es zu einer Steigerung der Schleimbildung, worin W. SCHMIDT²⁸⁾ einen wesentlicheren Faktor sieht als in der Peristaltikanregung.

E. LENZ²⁹⁾ nahm an, daß die Wirkstoffe auf ihrem normalen Wege durch direkten Kontakt mit der Darmwand wirken. Das konnte er beweisen durch die abführende Wirkung von Anthrachinonklysmen und durch die Aufhebung der abführenden Wirkung durch gleichzeitig mit Anthrachinonderivaten oral gegebene Lokalanaesthetica, welche die sensiblen und sekretorischen Rezeptoren blockieren.

Dagegen stellte W. STRAUB³⁰⁾ heraus, daß die Sennaglykoside nach Resorption im Dünndarm ihre Wirkung nach Wiederausscheidung in den Dickdarm entfalten, wobei im Blut eine Spaltung der Glykoside stattfinden sollte. W. STRAUB schloß dies daraus, daß die Dosis von Anthrachinonderivaten, die nach subkutaner Injektion abführend wirkt, in der gleichen Größenordnung liegt wie die orale Wirkungs-dosis. Ferner wirkten subkutan zugeführte Anthrachinonglykoside im Gegensatz zu anderen Abführmitteln auch dann, wenn der Dünndarm unterbunden war.

So gegensätzlich beide Ansichten zu sein scheinen, lassen sie sich doch nach L. SCHMIDT³¹⁾ gut vereinigen. Beobachtungen an Mensch und Tier sprechen sogar für ein Ineinanderübergreifen beider Wirkungsmechanismen. Die Wirkung nach einer peroralen Gabe von "Pursennid" tritt bei Mensch und Tier nach etwa der gleichen Zeit ein wie nach anderen dickdarmwirksamen Abführmitteln, z.B. "Isacen (R)" (Diacetyl-bis-hydroxy-phenyl-isatin), "Phenolphthalein" oder "Laxans Thomae (R)" ((4,4'-Diacetoxy-diphenyl)-(pyridyl-

27) HENDERSON, W.

Canad.med.Assoc.J. 32, 538 (1935);
ref.: U.S.Dispensatory, 25.Ed., S.1229

28) SCHMIDT, W.

Arzneimittel-Forsch. 2, 6 (1952)

29) LENZ, E.

Schweiz.med.Wschr. 53, 887 (1923)

30) STRAUB, W. u.

Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 175,
528 (1934)

TRIENDL, E.

Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 226,
219 (1955)

31) SCHMIDT, L.

2)methan). Während aber bei diesen Mitteln nur eine 1- oder 2malige Entleerung erfolgt, führen "Pursennid" und andere Anthrachinonderivate zu einer länger anhaltenden Wirkung mit zahlreichen Entleerungen. Dies weist darauf hin, daß die Anthrachinonderivate zunächst durch direkten Kontakt mit der Darmschleimhaut wirken; die länger anhaltende und zusätzliche Wirkung kommt aber erst durch die resorbierten und in den Dickdarm wieder ausgeschiedenen Anteile zustande. Nach O. E. SCHULTZ³²⁾ ist beim Menschen der unmittelbare Transport durch den Dünndarm zum Dickdarm für den praktischen Effekt entscheidend.

Die Spaltung der Glykoside erfolgt nach W. SCHMID²⁸⁾ durch Bakterien oder Fermentwirkung. Die Genine sind als die eigentlichen Träger der Wirkung anzusehen. Liegen die Genine nicht in der Anthron- bzw. Anthranolform vor, sondern in Anthrachinonform, so müssen sie zuerst reduziert werden. Diese Reduktion erfolgt, wie W. SCHMID durch Reagensglasversuche und in vivo bewies, ebenfalls durch Darmbakterien, besonders durch das Bacterium coli. Beim Stehenlassen eines Infuses oder einer anderen wäßrigen Anthrachinonzubereitung wird durch Hydrolyse mit nachfolgender Oxydation ebenfalls die Anthrachinonform gebildet (W. STRAUB und H. GEBHARDT²⁵⁾). Die Bildung dieser oxydierten Stufe geht auf Kosten der Wirksamkeit, denn Anthronglykoside wirken nach J. W. FAIRBAIRN³³⁾ etwa 3mal so stark wie die reduzierten Aglykone, während das oxydierte Aglykon fast wirkungslos ist. So wirkt ein im Arzneihandel befindliches oxydiertes Aglykon, das "Istizin (R)" (1,8-Dioxyanthrachinon) in viel geringerem Maße, weil die Abführwirkung erst nach Reduktion zum entsprechenden Anthron durch die Darmbakterien eintreten kann. Es läge nun nahe, an eine Verabreichung von Anthronen oder Anthranolen als Genine zu denken, um somit eine bei möglichst kleinen Dosen optimale Abführwirkung zu erreichen. Jedoch führen derartige Substanzen im Magen wie auch

32) SCHULTZ, O.E.

Pharmaz. 5, 501 (1950)

28) SCHMID, H.

Arzneimittel-Forsch. 2, 6 (1952)

25) STRAUB, W. u.

Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 18, 399 (1936)

GEBHARDT, H.

33) FAIRBAIRN, J. W.

J. Pharmacy Pharmacol. 1, 683 (1949)

allgemein auf der Haut zu starken Reizerscheinungen (Cignolin, ein 1,8-Dioxyanthranol). Außerdem oxydieren die Aglykone der Sennosid- und anderer Anthrachinonglykoside schon an der Luft sehr leicht zum Anthrachinon.

Das Frangulaglykosid ist sehr leicht spaltbar, es zerfällt schon im Magen zu einem monomolekularen Anthron und dem Zuckeranteil und führt so über starke Magenreizung zu Erbrechen. Die Droge Cortex Frangulae wird deshalb ein Jahr künstlich gealtert, wobei das Glykosid oxydiert wird. Bei Verwendung der Droge als Abführmittel muß das Glykosid von den Darmbakterien wieder reduziert werden, um eine Wirkung zu entfalten.

Anders verhält es sich mit den Inhaltsstoffen der Sennesblätter, den Sennosiden. Diese werden erst im Darm gespalten und brauchen nicht mehr reduziert zu werden. Deshalb wirken schon geringe Mengen "Pursennid" (12 - 24 mg Sennoside A + B) zuverlässig abführend, während beim schon erwähnten "Istizin" Dosen von 150 - 300 mg, also etwa die 10fache Menge (Zuckeranteile unberücksichtigt) erforderlich sind. Nach O. E. SCHULTZ³⁴⁾ ist das Anthronmolekül zudem in bimolekularer Form reizloser als in monomolekularer. Der Zuckeranteil der Sennoside hat die Funktion eines Transportmittels, indem er auf Grund der relativ schweren Spaltbarkeit des Glykosids die Wirkstoffe in reizloser Form an den Ort der Wirkung bringt, und zudem die Funktion eines "Beschützers" (protector, FAIRBAIRN) des Aglykons vor Oxydation und damit vor Wirkungsverlust.

Somit stellt "Pursennid" als isolierter Drogeninhaltsstoff den Idealfall eines Abführmittels von Anthrachinoncharakter dar. Es hat sich in Klinik und Praxis bereits bestens bewährt und wirkt nach R. MARRI³⁵⁾ sowohl gegen spastische als auch gegen atonische Obstipation.

90% der in den Sennesblättern enthaltenen Anthronglykoside stellen nach W. KUSSMAUL und B. BECKER^{11d)} die Sennoside A + B

34) SCHULTZ, O.E.

35) MARRI, R.

Arzneimittel-Forsch. 2, 49 (1952)
La Settimana Med. 37, 591 (1949)
ref.: Boll. chim. Farmac. 93, 203
(1954)

11d) KUSSMAUL, W. u.
BECKER, B.

Helv. chim. Acta 33, 313 (1950)

dar. Die restlichen 10% werden von einem noch nicht näher aufgeklärten Glykosid gebildet, dessen Genin Aloe-Emodin ist. Beim Aloe-Emodin ist die COOH-Gruppe des Rheins (siehe S. 34) durch eine CH₂OH-Gruppe ersetzt. Außerdem finden sich in einer guten Droge nicht mehr als 1% der Anthrachinonderivate als freie Aglykone, die dann natürlich oxydiert als Rhein vorliegen.

Der Sennosidgehalt der Sennesblätter läßt sich nach der Methode von W. KUSSMAUL und B. BECKER, modifiziert von H. AUTERHOFF²²⁾ exakt quantitativ bestimmen. Durch vergleichende Prüfung von Droge und isoliertem Wirkstoff (Pursennid) kann festgestellt werden, ob die Sennoside allein für die Wirkung der Sennesblätter verantwortlich sind, oder ob noch andere Stoffe an der pharmakologischen Wirkung beteiligt sind. J. W. FAIRBAIRN und M. R. I. SALEH¹⁰⁾ überprüften das zu einem geringen Prozentsatz vorhandene Aloe-Emodin-Glykosid in dieser Beziehung und fanden, daß es, allein verabreicht, die gleiche Wirkung entfaltete wie die Sennoside A und B. Wurde es aber mit den Sennosiden in verschiedenen Verhältnissen kombiniert, so trat ein bemerkenswerter synergistischer Effekt auf. Der Gesamtglykosidgehalt der Folia Sennae verursacht aber nach diesen Autoren trotzdem nur 60 - 70% der Wirksamkeit verglichen mit der Droge.

F. MESTWERDT³⁶⁾ fand, daß die Wirkungsstärke der untersuchten Folia Sennae-Präparate ihrem chemisch bestimmten Sennosidgehalt praktisch proportional war. Alle Präparate waren aber ebenso wie die Droge relativ wirksamer als nach dem Gehalt an Sennosiden zu vermuten war. F. MESTWERDT schrieb aber diese Tatsache nur einem Synergismus zwischen den Sennosiden und dem Aloe-Emodin-Anteil zu.

H. AUTERHOFF³⁷⁾ fand einen solchen Synergismus auch zwischen Sennosiden und einer Rhabarberdroge, die ebenfalls noch andere Anthrachinonderivate enthielt.

22) AUTERHOFF, H.

Arzneimittel-Forsch. 1, 412 (1951)

10) FAIRBAIRN, J. W. u.

J. Pharmacy Pharmacol. 3, 93 u. 918 (1951)

SALEH, M. R. I.

36) MESTWERDT, F.

Dissertation, Würzburg 1952, Pharmakologisches Institut

37) AUTERHOFF, H.

Arzneimittel-Forsch. 3, 23 (1953)

2. Die abführende Wirkung von Kämpferolglykosid

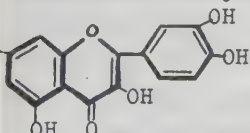
Ein wasserlösliches Kämpferolglykosid, isoliert aus Samen *Rhamni japonici*, führte nach T. FUKUDA³⁾ und I. SHIINA³⁸⁾ peroral gegeben, zu Diarrhoe bei Mäusen und Katzen. Bei Katzen erreichte man auch durch subkutane Injektion dieses Stoffes eine abführende Wirkung, mußte aber dessen Dosis erhöhen. Über die Dosen selbst und über die Versuchsanordnungen machen die Autoren leider keine näheren Angaben.

T. FUKUDA³⁾ berichtete weiter von klinischen Versuchen, die ebenfalls positiv ausfielen. In einer Dosis von 0,8 g beobachtete er konstant Diarrhoe, dabei Kollern und manchmal leichte Koliken, aber keine sonstigen Nachwirkungen.

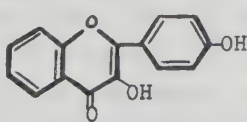
Nach der Injektion von Kämpferolglykosid in das Darmlumen in situ wurden die Bewegungen der Darmschlinge stärker, und der Tonus des Darmes nahm zu. T. FUKUDA sah hierin eine direkte Wirkung des Mittels auf die Darmschleimhaut. Bei Untersuchung an ausgeschnittenen Darmstücken nach der Methode von R. MAGNUS³⁹⁾ fand T. FUKUDA keine erregende, sondern nur lähmende Wirkung bei höherer Konzentration und stellte hierin Übereinstimmung mit anderen vegetabilischen Abführmitteln fest.

3. Die abführende Wirkung von Quercetin

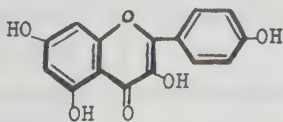
In einer Arbeit über die pharmakologische Wirkung synthetischer Laxantien in Beziehung zu ihrer chemischen Konstitution untersuchten L. SCHMIDT und E. SEEGER⁹⁾ auch Quercetin und ein synthetisches 4'-Oxyflavonol.



Quercetin



4'-Oxyflavonol



Kämpferol

3) FUKUDA, T.

Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 164,
685 (1932)
ref. in 3)

38) SHIINA, I.

39) MAGNUS, R.

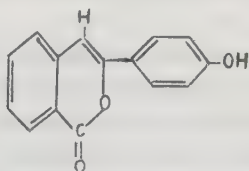
Pflügers Arch. ges. Physiolog. Menschen
Tiere 102, 123 (1904)

9) SCHMIDT, L. u.
SEEGER, E.

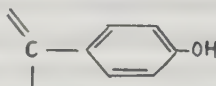
Arzneimittel-Forsch. 6, 22 (1956)

Sie fanden nach Verabreichung von Dosen von etwa 250 mg/kg Ratte eine laxierende Wirkung; andere Substanzen hatten schon in Dosen von 1 - 50 mg/kg gewirkt. Die Substanzen wurden von ihnen den Ratten in öligler Suspension mit der Schlundsonde eingegeben.

Die Autoren waren von der Überlegung ausgegangen, daß diese untersuchten Substanzen eine gewisse Ähnlichkeit mit dem von M. BUU-HOI⁴⁰⁾ als laxierend gefundenen p-Oxyphenyl-isocumarin besitzen, ohne jedoch dessen Lactonring zu enthalten. Sie schlossen aus ihren Untersuchungen, daß Substanzen, welche nur einen p-Oxyphenylrest, mit einem Kohlenstoff-Atom verbunden, aufweisen, eine abführende Wirkung entfalten können.



p-Oxyphenyl-isocumarin



p-Oxyphenylrest mit
einem C-Atom

Die Einführung von Methylgruppen in diese Moleküle bringt nach L. SCHMIDT und E. SEEGER⁹⁾ Wirkungsabfall mit sich.

40) BUU-HOI, M.

C. R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. 210,
418 (1940)

9) SCHMIDT, L. u.
SEEGER, E.

Arzneimittel-Forsch. 6, 22 (1956)

B. Auswahl geeigneter Methoden

Zur Prüfung von Abführmitteln stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung. Bei der Auswahl einer geeigneten Methode zum Nachweis eines Synergismus von Anthrachinonderivaten mit Flavonolabkömmlingen und der abführenden Wirkung von Flavonolen ließen wir uns von zwei Gesichtspunkten leiten. Es mußte einmal dem komplizierten Wirkungsmechanismus der Anthrachinone Rechnung getragen werden; zum anderen mußten sich die pharmakologischen Tests auf Versuche beschränken, die ohne große Eingriffe am Tier durchgeführt werden konnten.

Da die Abführmittel in erster Linie für den Menschen bestimmt sind, wäre der Mensch auch das brauchbarste Testobjekt zur qualitativen und quantitativen Auswertung der Wirkung von Abführmitteln, zumal gerade die Testung einer solchen Wirkung im Vergleich zur Wirkung anderer Arzneimittel relativ ungefährlich ist. Jedoch eignet sich der Mensch nach Angaben zahlreicher Autoren L. THER⁴¹⁾ zu derartigen Versuchen nicht, da verschiedene individuelle Empfindlichkeit und psychische Einflüsse zu stark divergierenden Resultaten führen und ein diesen Fehler ausschaltender Versuch mit zahlreichen Versuchspersonen aus technischen Gründen nicht in Frage kommt. Trotzdem wurden zur Abrundung unserer Ergebnisse einige Selbstversuche durch Einnahmen größerer Mengen von Flavonolen durchgeführt.

Die Prüfung erfolgte deshalb vor allem im Tierexperiment. Die Ergebnisse solcher Versuche können allerdings nicht immer und ohne Einschränkung auf den Menschen übertragen werden. Denn bekanntlich gibt es Arzneimittel, die im Tierversuch wirksam, beim Menschen jedoch ohne nachweisbaren Einfluß sind.

Für die Prüfung einer abführenden Substanz kommen grundsätzlich drei pharmakologische Methoden in Frage:

1. die Untersuchung am intakten Tier;
2. die Prüfung unter Anwendung operativer Eingriffe und
3. die Untersuchung am isolierten Erfolgsorgan, Dünn- bzw. Dickdarm.

41) THER, L.

Pharmakologische Methoden, Stuttgart 1949

Die operativen Methoden und die Wirkungsanalyse am isolierten Darm haben große Bedeutung, wenn es sich darum handelt, den pharmakologischen Angriffspunkt zu ermitteln, nachdem eine Abführwirkung am intakten Tier feststeht. In unseren eigenen Versuchen konnten wir uns auf die Untersuchung am intakten Tier und auf die Prüfung am isolierten Warmblüterdarm beschränken.

1. Methodik der Untersuchung am intakten Tier

Für die Untersuchung am intakten Tier sind verschiedene Versuchstiere wie Rhesusaffe, Hund, Katze, weiße Ratte, weiße Maus und auch Wasserflöhe (Daphnien) vorgeschlagen worden. Die klassischen Arbeiten auf dem Anthrachinongebiet bedienten sich durchweg der weißen Maus als Versuchstier. Sie schien uns auch zum Nachweis einer synergistischen Wirkung der Anthrachinonderivate mit Flavonolen nach den vorliegenden Befunden am besten geeignet. Unsere Versuche wurden deshalb durchweg an der weißen Maus durchgeführt. Gegenüber den hauptsächlich von L. SCHMIDT⁴²⁾ verwendeten weißen Ratten hat die Maus ein wesentlich geringeres Gewicht (Maus ca. 20 - 25 g, Ratte mindestens 100 - 125 g) und ist auch leichter in der Handhabung. Mit der gleichen Menge einer Substanz können an Mäusen etwa 5mal mehr Versuche durchgeführt werden, was bei uns wegen der geringen Menge, die uns bei zwei Substanzen zur Verfügung stand, von großer Bedeutung war.

Die weiße Maus wurde erstmals von H. FÜHNER⁴³⁾ zur Prüfung von Anthrachinonkörpern verwendet. Auch S. LOEWE und G. FAURE⁴⁴⁾, W. STRAUB²⁶⁾ und E. GEIGER⁴⁵⁾ sahen die Maus als brauchbares Testobjekt für Abführmittel an. In neuester Zeit führten J. W. FAIRBAIRN und M. R. I. SALEH¹⁰⁾ sowie F. MESTWERDT³⁶⁾ entsprechende

42) SCHMIDT, L.

Arzneimittel-Forsch. 3, 19 (1953)

43) FÜHNER, H.

Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 105, 249 (1925)

44) LOEWE, S. u. FAURE, G.

Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 107, 271 (1925)

26) STRAUB, W.

Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 185, 1 (1937)

45) GEIGER, E.

J.Amer.pharmac.Assoc., sci. Ed. 29, 148 (1940)

10) FAIRBAIRN, J. W. u.

J.Pharmacy Pharmacol. 3, 93 u. 918 (1951)

SALEH, M. R. I.

36) MESTWERDT, F.

Dissertation, Würzburg 1952, Pharmakologisches Institut

Versuche mit weißen Mäusen durch. Nach H. FÜHNER und I. FERNANDEZ⁴⁶⁾ entspricht die beim Menschen wirksame Menge der etwa 150 - 200fachen Mäusedosis. W. STRAUB und H. GEBHARDT²⁵⁾ konnten dies auf anderem Wege bestätigen.

Die Maus steht als Omniphore hinsichtlich Anatomie und Physiologie des Magens und Darmes nach W. SCHMID²⁸⁾ dem Menschen sehr nahe. Die an ihr durchgeführten Experimente lassen sich auf den Menschen meist sehr gut übertragen. Weiße Mäuse sind auch als Versuchsobjekt relativ wirtschaftlich. Aufgenommene Nahrung passiert den Magen-Darmtrakt in relativ kurzer Zeit. Es ist somit möglich, größere Versuchsreihen nebeneinander zu beobachten.

Die zur Untersuchung gelangenden Mäuse hatten ein Gewicht von 18 - 26 g. F. MESTWERDT³⁶⁾ hatte bei seinen Versuchen eine Maus mit 20 g gerechnet und jeder Maus die gleiche Menge der zu untersuchenden Substanz verabreicht. Wir wogen vor dem Versuch jede Maus einzeln und bezogen die verabreichte Dosis auf das Gramm Maus. Verwendet wurden insgesamt etwa 500 Mäuse, von denen zu einem Versuch jeweils 40 herangezogen wurden und wobei darauf geachtet wurde, daß die gleiche Maus zwei Wochen Ruhepause zwischen zwei Versuchen hatte. Nach M. WOODS und I. W. GROTE⁴⁷⁾ tritt unter diesen Bedingungen keine Gewöhnung ein. Die zu untersuchenden Substanzen wurden mit der Schlundsonde zugeführt. Es wurde darauf Wert gelegt, daß die Standardsubstanz immer in gleicher Konzentration in der Lösung vorlag, denn F. MESTWERDT³⁶⁾ hatte gefunden, daß die gleiche Gewichtsmenge eines Abführmittels in höherer Konzentration stärker wirkt. Die Lösungen wurden so eingestellt, daß einer 20 g schweren Maus nie mehr als 0,5 ml Flüssigkeit eingegeben wurde. Durch die Schlundsonden-Methode sind Dosierung und Zeitpunkt der Verabreichung gegenüber einer einfachen Fütterung sicher zu bestimmen. Außerdem wird dadurch eine etwa unvollständige Aufnahme der in die Nahrung eingearbeiteten Substanz (Pillen, Brei) vermieden. Die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens betonten

25) STRAUB, W. u.
GEBHARDT, H.

Arch.exp.Pathol.Pharmakol.181, 399
(1936)

28) SCHMID, W.

Arzneimittel-Forsch. 2, 6 (1952)

36) MESTWERDT, F.

Dissertation, Würzburg 1952, Pharmakologisches Institut

47) WOODS, M. u. GROTE, I. W.

J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Ed. 40, 198
(1951)

schon die Autoren E. GEIGER⁴⁵⁾, L. C. MILLER und E. B. ALEXANDER⁴⁸⁾, S. LOEWE und G. FAURE⁴⁴⁾, W. STRAUB²⁶⁾, O. E. SCHULTZ³⁴⁾, W. SCHMID²⁸⁾ und F. MESTWERDT³⁶⁾ u.a. In unseren Versuchen fand als Schlundsonde eine Knopfkanüle (größter äußerer Durchmesser etwa 1 mm, Länge 6 cm) Verwendung, an die eine Rekordspritze im Fassungsvermögen von 1 ml mit 1/100 ml Einteilung angeschlossen war. Die Zufuhr der Wirkstoffe mit der Schlundsonde erfolgte mit größter Sorgfalt, vor allem hinsichtlich der Dosierung.

Die Beobachtungszeit betrug in Anlehnung an F. MESTWERDT³⁶⁾ 6 Stunden, da nach W. SCHMID²⁸⁾ die normale Darmpassagezeit der Maus 3 - 4 Stunden beträgt und F. MESTWERDT³⁶⁾ nach der 6. Stunde nie mehr eine Abführwirkung registrierte. Die Mäuse wurden jeweils bis 11 Uhr vormittags sondiert, so daß zwischen 17 und 18 Uhr das Ergebnis festgestellt werden konnte. Vor dem Versuch wurden um 7 Uhr früh jeweils 50 Mäuse unter Entzug von Futter und Wasser in Einzelkäfige gesetzt. Zum eigentlichen Versuch wurden immer je 40 Mäuse verwendet. Mäuse, die zwischen 7 und 10 Uhr breiigen oder dünnflüssigen Kot aufwiesen, wurden zum Versuch nicht verwendet. Nach der Sondierung kam jede Maus in ein einzelnes Mäuseglas und erhielt 1 Würfel "Latz-Standardkost"*) , um die physiologische Magen-Darmtätigkeit nicht für zu lange Zeit zu unterbrechen. Eine Wasserzufuhr wurde nicht für nötig gehalten, da die Mäuse durch die Sondierung genügend Flüssigkeit aufgenommen hatten. Während der ganzen Zeit der Vorbeobachtung und nach der Sondierung befanden sich die Mäuse in einem vor Zugluft geschützten Digestorium mit konstanter Temperatur (siehe Abb. 6, S. 45). Mit Hilfe von in die Digestorien eingebauten Thermostaten konnte die Temperatur auf 25° C gehalten werden.

-
- | | |
|--|--|
| 45) GEIGER, R. | J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Ed. <u>29</u> ,
148 (1940) |
| 48) MILLER, L. C. u.
ALEXANDER, E. B. | J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Ed. <u>38</u> ,
417 (1949) |
| 44) LOEWE, S. u.
FAURE, G. | Arch.exp.Pathol.Pharmakol. <u>107</u> , 271
(1925) |
| 26) STRAUB, W. | Arch.exp.Pathol.Pharmakol. <u>185</u> , 1
(1937) |
| 34) SCHULTZ, O. E. | Arzneimittel-Forsch. <u>2</u> , 49 (1952) |
| 28) SCHMID, W. | Arzneimittel-Forsch. <u>2</u> , 6 (1952) |
| 36) MESTWERDT, F. | Dissertation, Würzburg 1952, Pharma-
kologisches Institut |
- * Kraftfutterwerk Latz, Euskirchen/Rheinland

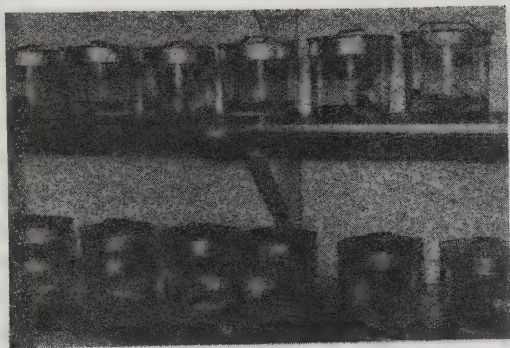


Abb. 6

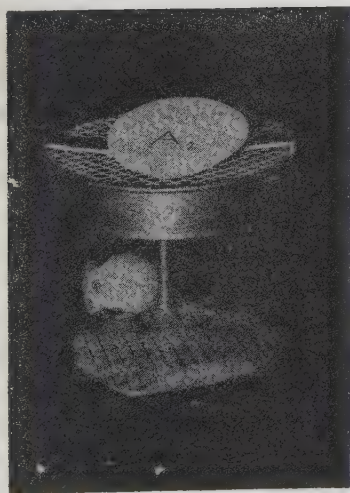


Abb. 7

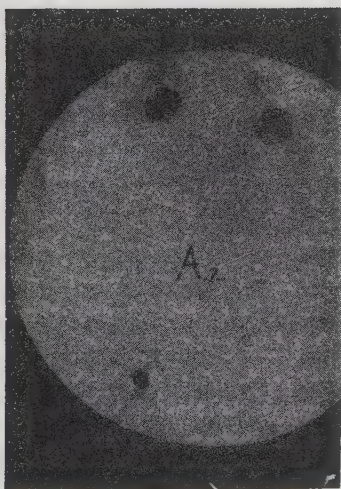


Abb. 8

Bei hoher Außentemperatur, während der schon die Zimmertemperatur wesentlich höher lag, wurden keine Versuche durchgeführt. Diese Versuchsanordnung wurde getroffen, da nach Angaben verschiedener Autoren Mäuse hinsichtlich Kotbeschaffenheit durch Temperatur und Wetterschwankungen sehr beeinflussbar sind.

In den runden Mäusegläsern befanden sich ca. 3 cm über dem Boden Drahtgitter mit einer Maschenweite von 1 cm (siehe Abb. 7, S. 45). Auf dem Boden lag ein rundes Filtrierpapier $\varnothing$ 15 cm (Nr. 595, Firma Schleicher & Schüll), das den ganzen Boden bedeckte und auf dem sich der ausgeschiedene Kot sammelte.

Als Kriterium für eine positive Abführwirkung wurde von uns angesehen, wenn ein oder mehrere Kotballen so dünnflüssig waren, daß sich an der Unterseite des Filtrierpapiers braune Flecken zeigten (siehe Abb. 8, S. 45), (fecal staining method nach L. W. HAZELTON⁴⁹⁾ und N. M. FERGUSON⁵⁰⁾). Nach einiger Übung lassen sich solche Flecken, von mehr schmutzig gelbbraun gefärbten Flecken, die durch zufälliges Auftreffen von Urintropfen auf festen Kot entstehen, leicht unterscheiden. Die Art der Auszählung der positiven Wirkung erschien uns etwas weniger willkürlich als die von F. MESTWERDT³⁶⁾ ausgewählte Einteilung des Kotes in vier Gruppen, wobei mindestens zwei Entleerungen der Gruppe 2 (breiiger Kot) oder mindestens eine Entleerung der Gruppe 3 (schmierig-schleimiger Kot) als positiv erachtet wurden.

Jedoch wurde nicht die Anzahl der breiigen Entleerungen von uns auf das Gewicht der Mäuse bezogen, wie T. C. LOU⁵¹⁾ (wet faeces per kg mice) vorgeschlagen hatte, sondern nach L. C. MILLER und E. B. ALEXANDER⁴⁸⁾ die gefundenen Prozentzahlen der positiv reagierenden Tiere graphisch in ein Ordinatensystem eingetragen. F. MESTWERDT³⁶⁾ hatte beide Methoden der Auszählung

-
- | | |
|--|---|
| 49) HAZELTON, L. W. | J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Ed. <u>33</u> ,
170 (1944) |
| 50) FERGUSON, N. M. | J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Ed. <u>45</u> ,
685 (1956) |
| 36) MESTWERDT, F. | Dissertation, Würzburg 1952, Pharma-
kologisches Institut |
| 51) LOU, T. C. | J.Pharmacy Pharmacol. <u>1</u> , 673 (1949) u.
<u>3</u> , 225 (1951) |
| 48) MILLER, L. C. u.
ALEXANDER, E. B. | J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Ed. <u>38</u> , 417
(1949) |

miteinander verglichen und keine genaueren Werte mit der LOU-schen Methode ermittelt. In dem Ordinatensystem stellen die Prozentwerte der positiv reagierenden Tiere und die zugehörige Dosis der Standardsubstanz (Pursennid) pro g Maus die Abszisse dar, die bei uns logarithmisch unterteilt wurde. Durch die logarithmische Auftragung der Dosis erhält man geradlinigere Dosiswirkungskurven.

Aus der Dosiswirkungskurve kann durch Interpolation bei einem Ordinatenwert von 50% die sogenannte Effektivdosis = ED 50 einer Substanz ermittelt werden. Das ist die Dosis, bei der 50% der untersuchten Tiere positiv, d.h. in diesem Falle mit Filtrierpapier färbendem Kot reagierten. Wir stellten zahlreiche Dosiswirkungskurven für unsere Standardsubstanz "Pursennid" auf und erhielten dabei konstante ED 50-Werte.

Es wurde nun untersucht, ob im Falle einer Kombination mit Flavonolen diese ED 50 erniedrigt wurde. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in wäßrigem Milieu verabfolgt. Da aber die untersuchten Flavonole und auch die Sennadroge in Wasser nicht löslich waren, stellten wir uns mit Hilfe von Tylose und Propylenglykol Suspensionen bzw. Lösungen unserer Wirkstoff-Kombinationen her. Die Dosiswirkungskurven für die Standardsubstanz mußten dementsprechend ebenfalls mit Zusatz der gleichen Menge dieser Lösungsvermittler hergestellt werden.

Unsere Standardlösung enthielt in 100 ml 50 mg "Pursennid". (Berechnet auf Sennosid A und B). Bei Verwendung von Tylose wurde die entsprechende Menge "Pursennid" und gegebenenfalls das feingepulverte Flavonol mit 1%iger Tylose langsam angerieben und nach und nach so viel von dieser Tyloselösung zugegeben, daß wir die gewünschte "Pursennid"-Konzentration von 0,05% für die sondierten Lösungen erhielten*). Die Lösungen mußten jeden Tag frisch bereitet werden, da bei längerem Stehen Ausflockungen von "Pursennid" auftraten. Wurde Propylenglykol als Lösungsvermittler verwendet, so wurden die Flavonole in wenigen ml davon gelöst und mit der schon bereiteten wäßrigen "Pursennid"-Lösung

*) "Pursennid"-Pulver (60% Sennoside A + B) wurde uns freundlicherweise von der Firma SANDOZ, Basel, durch Vermittlung ihres Mitarbeiters, Herrn Dr. H. Bus, München, zur Verfügung gestellt.

in der Weise verdünnt, daß die sondierte Lösung jeweils 0,05% "Pursennid", 1% Propylenglykol und wechselnde Anteile von Flavonolen enthielt.

Im Laufe unserer Untersuchungen gingen wir dazu über, auch hohe Konzentrationen von Flavonolen ohne Kombination mit "Pursennid" hinsichtlich ihrer Abführwirkung bei Mäusen zu überprüfen. Dazu wurden, da wir höhere Konzentrationen der Lösungsvermittler als störend erachteten, die in Wasser unlöslichen Substanzen im Mörtel mit Wasser langsam angerieben und anschließend sofort nach Aufschütteln sondiert. Es gelang so, ohne Rückstand eines Bodensatzes, immer die gewünschte Menge der betreffenden Flavonole zu verabreichen.

Ein Versuchstag mit 40 Mäusen wickelte sich so ab, daß jeweils 20 Tiere die gleiche Dosis der zu untersuchenden Substanz erhielten. Auf einem Protokollblatt wurde das Gewicht jeder Maus registriert, die daraus berechnete Dosis und die Anzahl der zu verabreichenden ml der untersuchten Lösung eingetragen, und die positiven Abführwirkungen und die Zeit, nach der diese erfolgten, aufgeführt (Beispiel, siehe Untersuchungsteil, S. 67). War eine positive Wirkung zu verzeichnen, so trat diese in unseren Versuchen meist nach 3 - 4 Stunden ein. In ganz vereinzelt Fällen wurden noch Durchfälle nach 5 Stunden registriert. Über 6 Stunden hinaus konnten wir nie mehr eine Abführwirkung feststellen.

Die schon erwähnte Dosiswirkungskurve für "Pursennid" wurde in gewissen zeitlichen Intervallen überprüft, um zu sehen, ob jahreszeitliche Schwankungen die Ansprechbarkeit auf Abführmittel beeinflussen.

2. Methodik der Untersuchung am isolierten Warmblüterdarm

Die Prüfung am isolierten Erfolgsorgan erfolgte nach der Methode von R. MAGNUS³⁹⁾. Hierbei wird der Einfluß eines Wirk-

39) MAGNUS, R.

Pflügers Arch.Ges.Physiolog.Menschen
Tiere 102, 123 (1904); ref.: THER, L.
Pharmakologische Methoden, Stuttgart
1949

stoffes auf die Peristaltik und den Tonus eines überlebenden Darmstückes in physiologischer Salzlösung unter konstanten äußeren Bedingungen (Temperatur, Sauerstoffversorgung, Belastung) untersucht. Motorische Bewegung (Peristaltik) und Spannungszustand (Tonus) solcher überlebender Darmsegmente werden nervös vom AUERBACH'schen Plexus, einem autonomen Nervenapparat in der Darmwand gesteuert. Deshalb lassen sich am isolierten Warmblüterdarm nicht nur myogene, also auf die glatte Muskulatur des Darmes selbst wirkende, sondern auch neurogene Einflüsse feststellen. Isolierte überlebende Darmsegmente unterliegen nicht mehr der Einwirkung des Zentralnervensystems mit seinen fördernden und hemmenden Nerven und sind aus der Blutzirkulation ausgeschaltet. Deshalb dürfen die am isolierten Darm gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf das intakte Tier übertragen werden.

C. Eigene Untersuchungen

1. Versuche an der weißen Maus

a) Vergleich der Dosiswirkungskurven von Folia Sennae Tinnevely pulv. subt. und von "Pursennid"

Zur Binarbeitung in die Methode und zur Nachprüfung, ob die Droge relativ dem isolierten "Pursennid" tatsächlich überlegen ist, wurden die Dosiswirkungskurven beider Stoffe aufgestellt. Der Sennosidgehalt der Droge betrug 2,9%, der Emodingehalt 0,4%, zusammen rund 3% Wirkstoff (siehe chemischer Teil). Die Droge wurde in 1%iger Tyloselösung suspendiert, dementsprechend auch die 0,05%ige "Pursennid"-Lösung unter Zusatz von 1% Tylose bereitet.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß bei Dosen von 20 und 15 γ /g Maus alle untersuchten 20 Tiere mit starken Durchfällen reagierten, bei 10 γ reagierten von 20 Tieren 16 positiv und bei 5 γ 8 von 20. Es war somit zu erwarten, daß die Effektivdosis, bei der 50% aller Tiere positiv reagierten, in der Größenordnung zwischen 4 und 7 γ lag. Wir gaben 4mal je 20 Mäusen Dosen von 4, 5, 6 und 7 γ "Pursennid" ein und erhielten die in Tabelle 1 angeführten Resultate.

Zur statistischen Sicherung unserer Ergebnisse berechneten wir für jede Dosis und für jeden Versuch mit je 20 Mäusen die mittlere Abweichung vom Mittelwert nach L. THER⁴¹⁾. Die mittlere Abweichung vom Mittelwert (= $\bar{d}$) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\bar{d} = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}}$$

n = Anzahl der Versuche

d = Abweichung vom Mittelwert

$\sum d^2$ = Summe der Quadrate der Einzelabweichungen vom Mittelwert.

41) THER, L.

Pharmakologische Methoden, Stuttgart 1949

T a b e l l e 1

Gramm-Dosis in γ	Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittelwert	Mittl. Abwei- chung vom Mittelwert
4	6	30		
4	8	40		
4	8	40	35 %	+ 5,8%
4	6	30		
5	9	45		
5	10	50		
5	7	35	45 %	+ -7,1%
5	10	50		
6	12	60		
6	11	55		
6	9	45	53,75 %	+ 6,0%
6	11	55		
7	12	60		
7	12	60		
7	11	55	58,75 %	+ 4,3%
7	12	60		

Die gefundenen Mittelwerte wurden graphisch aufgetragen (siehe Abb. 9, S. 53), die Dosiswirkungskurve bei 50% interpoliert und der ED 50-Wert von 5,5 γ "Pursennid"/g Maus ermittelt. Da die Folia Sennae nach chemischer Bestimmung rund 3% Wirkstoff enthielten und nach I. W. GROTE und M. WOODS⁵²⁾ selbst bei 5 Jahren Lagerung kein Aktivitätsverlust der Droge zu verzeichnen war, gingen wir bei der Festlegung der ED 50 der Droge von der 30fachen Menge des getesteten "Pursennid" aus. Da aber bei 180 γ schon 65% aller Mäuse positiv reagierten, führten wir den vierten Versuch mit 100 γ Folia Sennae/g Maus durch. Es ergaben sich folgende Werte (siehe Tab. 2, S. 52):

52) GROTE, I. W. u. J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Ed. 33, 266
WOODS, M. (1944)

T a b e l l e 2

Gramm-Dosis in γ	Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittelwert	Mittl. Abwei- chung vom Mittelwert
120 = 3,64 γ	10	50		
120 Sennoside	9	45		
120	8	40	45	$\pm 4,1\%$
120	9	45		
150 = 4,55 γ	9	45		
150 Sennoside	11	55		
150	12	60	55	$\pm 7,0\%$
150	12	60		
180 = 5,45 γ	15	75		
180 Sennoside	14	70		
180	11	55	65	$\pm 9,1\%$
180	12	60		
100 = 3 γ	6	30		
100 Sennoside	12	60		
100	8	40	40	$\pm 14,1\%$
100	6	30		

Die graphische Auswertung (siehe Abb. 9, S. 53) ergab eine ED 50 von 133 γ .

Um "Pursennid" und die Droge miteinander vergleichen zu können, teilten wir die verwendeten Dosen der Droge durch 33, da sie etwa 3% Wirkstoff enthielt. Die somit ermittelten Sennosid-Werte trugen wir in Abbildung 9 mit den entsprechenden Prozentzahlen der positiv reagierenden Tiere ein und konnten so die Dosiswirkungskurven beider Stoffe direkt miteinander in Beziehung setzen. Für die Folia Sennae ergab sich daraus durch Interpolation ED 50 = 4,0 γ , d.h., daß die isolierten Wirkstoffe nach der Gleichung:

$$4,0 \gamma : 5,5 \gamma = x : 100; \quad x = 73\%$$

nur zu 73% an der abführenden Wirkung der Droge beteiligt sind.

Eine synergistisch oder auch additiv wirkende Komponente muß somit in der Droge auch nach unseren Ergebnissen vorhanden sein.

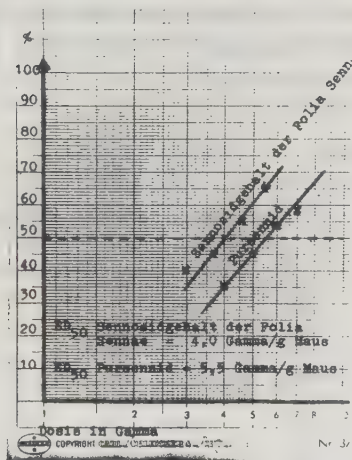


Abb. 9

b) Einfluß von Flavonolen auf die "Porsennid"-Wirkung

Es wurden folgende Flavonolderivate in ihrem Einfluß auf die Wirkung von "Porsennid" untersucht*):

1. Rutin
2. Quercetin
3. Kämpferol
4. Kämpferol-3-glukosid
5. Rhamnetin
6. Eluierte Flavonolglykoside der Folia Sennae
in dem in der Droge vorliegenden Mengenverhältnis.

Da die aufgeführten Flavonolderivate mit Ausnahme der in wäßriger Lösung vorliegenden Eluate nicht wasserlöslich sind, wurden sie in Propylenglykol gelöst und anschließend mit "Porsennid"-

*) Herkunft der Substanzen siehe S. 22 u. 23.

Lösung (50 mg auf 100 ml) so verdünnt, daß die Lösung 1% Propylenglykol enthielt. Dementsprechend mußte zuerst eine Dosiswirkungskurve für "Pursennid" mit 1% Propylenglykol kombiniert aufgestellt werden. Wir verabreichten zunächst Dosen von 5 und 6 γ /g Maus, bezogen auf "Pursennid". Die Tiere reagierten wie folgt:

T a b e l l e 3

Gramm-Dosis in γ	Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittelwert	Mittl. Abweichung vom Mittelwert
5	10	50		
5	6	30	40	$\pm 9,1\%$
5	7	35		
5	9	45		
6	10	50		
6	10	50	47,5	$\pm 7,0\%$
6	11	45		
6	11	45		
7	12	60		
7	11	55	55	$\pm 7,0\%$
7	12	60		
7	9	45		

Die Dosis 7 γ /g Maus hatten wir als dritten Wert hinzugenommen, da das "Pursennid" mit Propylenglykol nicht die gleichen Werte ergab wie mit Tylose und wir einen über 50% liegenden Wert zur Festlegung der ED 50 dieser Lösung benötigten. Der ED 50-Wert wurde nach Interpolation mit 6,3 γ /g Maus ermittelt.

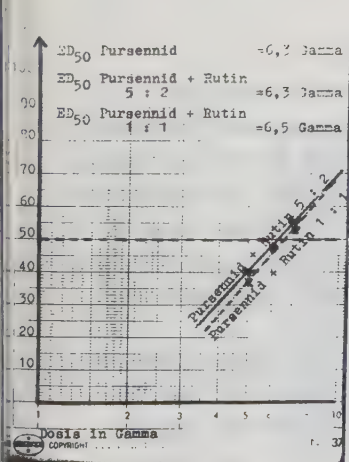
Die drei Werte, aus denen sich unsere neue Dosiswirkungskurve zusammensetzte, lagen erneut auf einer Linie. Bei der Untersuchung des Einflusses von Flavonolen beschränkten wir uns deshalb auf Ermittlung von zwei Werten für die Dosiswirkungskurve. Beide Werte wurden durch Versuche an je 4mal 20 Tieren auch statistisch gesichert, indem somit pro Dosis jeweils 160 Tiere Verwendung fanden.

1) "Pursennid" in Kombination mit Rutin

Die chemische Untersuchung der Sennadroge hatte ergeben, daß Anthraglykoside und Flavonolderivate etwa im Verhältnis 3:1 vorliegen. Wir verwendeten deshalb zunächst eine Lösung, die neben den üblichen 50 mg "Pursennid" 20 mg Rutin in 100 ml enthielt. Als Lösungsvermittler diente 1% Propylenglykol. Die Tiere reagierten nach Tabelle 4.

T a b e l l e 4

Gramm-Dosis in γ		Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittelwert	Mittl.Ab- weichung v. Mittelwert
Pursennid	Rutin				
5	2	7	35		
5	2	8	40		
5	2	9	45	40	± 4,1%
5	2	8	40		
7	2,8	10	50		
7	2,8	10	50		
7	2,8	12	60	55	± 5,8%
7	2,8	12	60		



Die Dosiswirkungs-kurve von mit Rutin kombiniertem "Pursennid" war somit in dieser Konzentration identisch mit der von reinem "Pursennid" (Abb. 10).

Abb. 10

In der angewendeten Konzentration wurde das "Pursennid" durch Rutin somit nicht beeinflusst. Im nächsten Versuch wurde der Anteil des Rutins erhöht und gleiche Mengen "Pursennid" und Rutin verabreicht. Die Reaktion der Tiere war nach Tabelle 5.

T a b e l l e 5

Gramm-Dosis in γ		Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittelwert	Mittl.Ab- weichung v. Mittelwert
Pursennid	Rutin				
5	5	8	40		
5	5	7	35		
5	5	7	35	37,5	± 2,9%
5	5	8	40		
.	7	11	55		
7	7	11	55		
7	7	9	45	53,75	± 6,0%
7	7	12	60		

Die Dosiswirkungskurve dieser Kombination lieferte nach Abb. 10 (siehe S. 55) einen ED 50-Wert von 6,5 γ. Auch hier war keine Verstärkung der "Pursennid"-Wirkung zu ersehen, eher eine minimale Abschwächung.

2) "Pursennid" in Kombination mit Quercetin

Im ersten Versuch wurden wiederum 50 mg "Pursennid" und 20 mg Quercetin kombiniert, die mit 1% Propylenglykol hergestellte Lösung wurde in zwei verschiedenen Dosen je 80 Mäusen verabreicht. (Resultate siehe Tabelle 6, S. 57). Aus der Dosiswirkungskurve dieser Kombination (siehe Abb. 11, S. 57) ergab sich ED 50 = 6,3 γ "Pursennid". Die Kurve verläuft etwas flacher als die bisherigen Dosiswirkungskurven, eine synergistische Beeinflussung von "Pursennid" war hier nicht festzustellen.

Als zweite Dosis wurde diesmal die 10fache Menge Quercetin verabreicht. Die Dosiswirkungskurve war identisch mit der von "Pursennid", die Abführwirkung wurde nicht beeinflusst (siehe Tabelle 7, S. 57).

Gramm-Dosis in γ	Pursennid	Quercetin	Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittel- wert	Mittl.Ab- weichung vom Mittel- wert
----------------------------	-----------	-----------	--	-----	-----------------	--

T a b e l l e 6

5	2	9	45			
5	2	8	40			
5	2	8	40	42,5	$\pm 4,1\%$	
5	2	9	45			
7	2,8	10	50			
7	2,8	11	55			
7	2,8	11	55	53,75	$\pm 3,2\%$	
7	2,8	11	55			

T a b e l l e 7

5	20	9	45			
5	20	8	40			
5	20	8	40	40	$\pm 4,1\%$	
5	20	7	35			
7	28	11	55			
7	28	11	55			
7	28	11	55	55	$\pm 0\%$	
7	28	11	55			

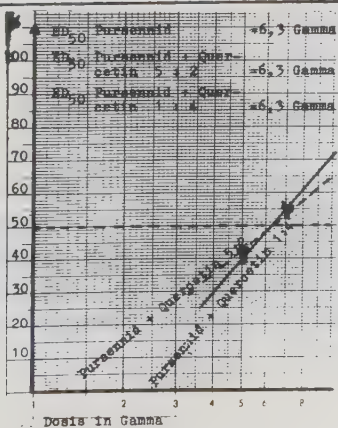


Abb. 11

3) "Pursennid" in Kombination mit Kämpferol

Die erste Versuchslösung enthielt in 100 ml 50 mg "Pursennid" + 20 mg Kämpferol. Ergebnis siehe Tabelle 8.

T a b e l l e 8

Pursennid	Gramm-Dosis in γ Kämpferol	Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittel- wert	Mittl. Ab- weichung vom Mittel- wert
5	2	9	45		
5	2	6	30		
5	2	8	40	38,75	$\pm 6,3\%$
5	2	8	40		
7	2,8	12	60		
7	2,8	9	45		
7	2,8	11	55	55	$\pm 7,0\%$
7	2,8	12	60		

In der zweiten Versuchsreihe wurde "Pursennid" mit der 5fachen Menge Kämpferol kombiniert. Ergebnisse siehe Tabelle 9.

T a b e l l e 9

Pursennid	Gramm-Dosis in γ Kämpferol	Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittel- wert	Mittl. Ab- weichung v. Mittelwert
5	10	12	60		
5	10	8	40		
5	10	6	30	40	$\pm 14,1\%$
5	10	6	30		
7	14	13	65		
7	14	10	50		
7	14	12	60	57,5	$\pm 6,5\%$
7	14	11	55		

Die Dosiswirkungskurven des mit Kämpferol in verschiedener Konzentration kombinierten "Pursennids" verliefen fast identisch mit der von reinem "Pursennid" (siehe Abb.12, S. 59). Die ED 50-Werte waren 6,4 bzw. 6,1 γ gegenüber 6,3 γ von "Pursennid". Eine syner-

gistische Wirkung zwischen "Pursennid" und Kämpferol konnte somit nicht nachgewiesen werden.

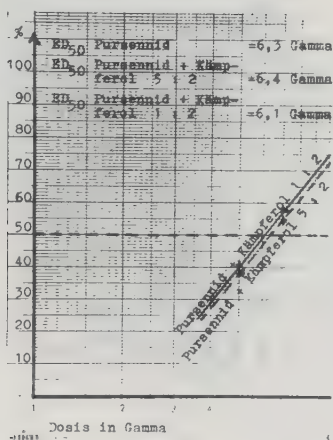


Abb. 12

Nach den Kombinationsversuchen von "Pursennid" mit 3 Flavonolderivaten überprüften wir die Dosiswirkungskurve von "Pursennid" da inzwischen die Jahreszeit etwas weiter fortgeschritten war und dieser klimatische Wechsel möglicherweise von Einfluß sein konnte. Wir fanden diesmal als ED 50 6,45 γ , während wir vorher 6,3 γ ermittelt hatten. Die Verhältnisse hatten sich somit praktisch nicht verändert, die geringe Abweichung konnte vernachlässigt werden.

4) "Pursennid" in Kombination mit Kämpferol- β -glukosid

In der ersten Versuchsreihe kamen wieder auf 50 mg "Pursennid" 20 mg des Flavonolderivates (siehe Tabelle 10, S. 60).

In der zweiten Versuchsreihe verwendeten wir die 25fache Menge (siehe Tabelle 11, S. 60).

Gramm-Dosis in γ	Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittel- wert	Mittl. Ab- weichung v. Mittelwert
Pursennid K-3-glukosid				

T a b e l l e 10

5	2	9	45		
5	2	7	35		
5	2	6	30	37,5	$\pm 6,5\%$
5	2	8	40		
7	2,8	12	60		
7	2,8	11	55		
7	2,8	10	50	53,75	$\pm 4,9\%$
7	2,8	10	50		

T a b e l l e 11

5	50	8	40		
5	50	8	40		
5	50	6	30	35	$\pm 5,8\%$
5	50	6	30		
7	70	9	45		
7	70	12	60		
7	70	11	55	53,75	$\pm 6,0\%$
7	70	11	55		

Die Dosiswirkungskurven von "Pursennid" mit beiden Kombinationen ergaben ED 50-Werte von 6,5 bzw. 6,7 γ (siehe Abb. 13, S. 61). Obwohl in einem Fall die 10fache Menge des Flavonolderivates gegenüber "Pursennid" zugesetzt wurde, wurde die ED 50 des "Pursennids" nicht erniedrigt, sondern sogar schwach erhöht.

5) "Pursennid" in Kombination mit Rhamnetin

Erste Versuchsreihe: 50 mg "Pursennid" + 20 mg Rhamnetin;
Zweite Versuchsreihe: 50 mg "Pursennid" + 200 mg Rhamnetin;
(siehe Tabellen 12 und 13, S. 61).

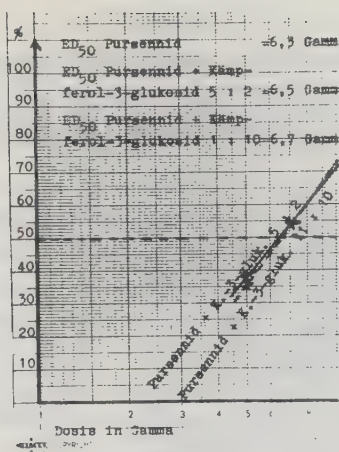


Abb. 13

Gramm-Dosis in γ	Von 20 Tieren	= %	Mittel-	Mittl. Abwei-
Pursennid	reagierten		wert	chung vom
Rhamnetin	positiv			Mittelwert

Tabelle 12

5	2	8	40		
5	2	7	35		
5	2	9	45	40	$\pm 4,1\%$
5	2	8	40		
7	2,8	9	45		
7	2,8	12	60		
7	2,8	12	60	55	$\pm 7,0\%$
7	2,8	11	55		

Tabelle 13

5	20	7	35		
5	20	7	35		
5	20	8	40	38,75	$\pm 4,8\%$
5	20	9	45		
7	28	12	60		
7	28	9	45		
7	28	10	50	50	$\pm 7,0\%$
7	28	9	45		

In Abbildung 14 werden die Dosiswirkungskurven des Rhamnetins mit der von "Pursennid" verglichen. Die ED 50-Werte waren 6,3 bzw. 7,0 γ ; wir fanden somit wiederum keine Verstärkung der "Pursennid"-Wirkung.

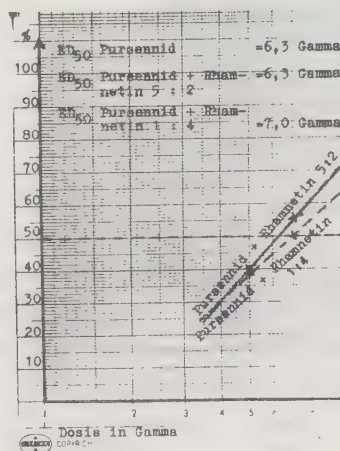


Abb. 14

6) "Pursennid in Kombination mit den papierchromatographisch eluierten Sennaflavonolglykosiden

Nachdem in den bisher angestellten Versuchen reine Flavonolsubstanzen die Abführwirkung des "Pursennids" nicht beeinflussten, versetzten wir in den letzten Kombinationsversuchen eine "Pursennid"-Lösung mit dem Gesamteluat der 4 Flavonolglykoside G₁ bis G₄ der Folia Sennae. Da diese Stoffe bereits in Wasser gelöst waren, arbeiteten wir diesmal ohne Zusatz von Propylenglykol. Zuvor mußte aber eine neue Dosiswirkungskurve aufgestellt werden, da das Propylenglykol möglicherweise darauf einen Einfluß hatte. Wir erhielten als ED 50 unserer wäßrigen 0,05%igen "Pursennid"-Lösung den Wert 6,4 γ /g Maus. Das bedeutete, daß Propylenglykol die Wirkung des "Pursennids" im

Gegensatz zu Tylose weder verstärkt noch hemmt. Nach Zusatz von 1% Tylose hatten wir eine ED 50 von 5,5 γ ermittelt.

In der ersten Versuchsreihe wurden auf 50 mg "Pursennid" 17 mg Gesamtsennaflavonolglykoside gegeben, um damit den in der Droge herrschenden Verhältnissen möglichst nahe zu kommen. In der zweiten Versuchsreihe kombinierten wir "Pursennid" mit der gleichen Menge der eluierten Sennaflavonglykoside (Tabellen 14 und 15)

Gramm-Dosis in γ	Pursennid Flavonglykos.	Von 20 Tieren reagierten positiv	= %	Mittelwert	Mittl.Abweichung v. Mittelwert
-------------------------	-------------------------	----------------------------------	-----	------------	--------------------------------

T a b e l l e 14

5	1,7	9	45	40	$\pm 5,8\%$
5	1,7	9	45		
5	1,7	7	35		
5	1,7	7	35		
7	2,38	12	60	55	$\pm 7,0\%$
7	2,38	11	55		
7	2,38	12	60		
7	2,38	9	45		

T a b e l l e 15

5	5	8	40	45	$\pm 7,0\%$
5	5	9	45		
5	5	8	40		
5	5	<u>11</u>	55		
7	7	9	45	55	$\pm 7,0\%$
7	7	11	55		
7	7	12	60		
7	7	12	60		

Die Dosiswirkungskurven der beiden Kombinationen ergaben 6,3 bzw. 6,0 γ . Da der Wert von 6,0 hauptsächlich durch den in der Tabelle unterstrichenen, etwas aus der Reihe fallenden, Wert zustande kommt, handelt es sich auch hier nicht um synergistische Wirkung (siehe Abb. 15, S. 64).

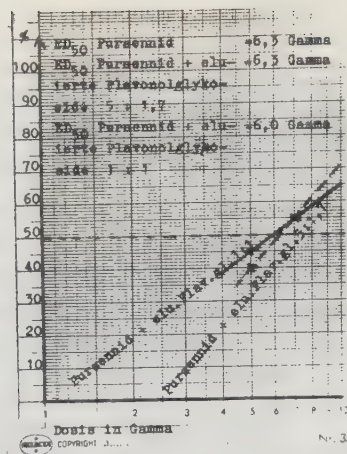


Abb. 15

Der Übersicht halber wurden die ED 50-Werte der einzelnen Kombinationen noch einmal in einer Tabelle zusammengefaßt:

T a b e l l e 16

Verhältnis der Substanzen			ED 50
"Pursennid" + ---			6,3 γ
"Pursennid" + Rutin	5 : 2		6,3 γ
"Pursennid" + Rutin	1 : 1		6,5 γ
"Pursennid" + Quercetin	5 : 2		6,3 γ
"Pursennid" + Quercetin	1 : 4		6,3 γ
"Pursennid" + Kämpferol	5 : 2		6,4 γ
"Pursennid" + Kämpferol	1 : 2		6,1 γ
"Pursennid" + Kämpferol-3-glukosid	5 : 2		6,5 γ
"Pursennid" + Kämpferol-3-glukosid	1 : 10		6,7 γ
"Pursennid" + ---			6,45 γ
"Pursennid" + Rhamnetin	5 : 2		6,3 γ
"Pursennid" + Rhamnetin	1 : 4		7,0 γ
"Pursennid" + ---			6,4 γ
"Pursennid" + Sennaflavonolglykoside	5 : 1,7		6,3 γ
"Pursennid" + Sennaflavonolglykoside	1 : 1		6,0 γ

Hinsichtlich der Zeit des Wirkungseintrittes beobachteten wir nie Unterschiede zwischen reinem "Pursennid" und den Kombinationen. Somit erscheint auch eine Wirkung über eine schnellere Darmpassage nicht gegeben.

Ein Synergismus zwischen "Pursennid" und 6 verschiedenen Flavonolen in verschiedener Konzentration konnte nicht festgestellt werden.

c) Prüfung der laxierenden Wirkung von Flavonolderivaten in höheren Konzentrationen

Von den fünf zur Verfügung stehenden Flavonolderivaten Rutin, Quercetin, Kämpferol, Kämpferol-3-glukosid und Rhamnetin wurden zwei verschiedene Dosen (100 γ /g und 500 γ /g) je 20 Mäusen mit der Schlundsonde eingegeben. Höhere Mengen konnten aus technischen Gründen in wäßrigen Anreibungen nicht verabfolgt werden.

1) R u t i n

Dosis/g	Von 20 Tieren reagierten positiv
100 γ	0
500 γ	0

2) Q u e r c e t i

Dosis/g	Von 20 Tieren reagierten positiv
100 γ	0
500 γ	1

3) K ä m p f e r o l

Dosis/g	Von 20 Tieren reagierten positiv
100 γ	0
500 γ	1

4) R h a m n e t i n

Dosis/g	Von 20 Tieren reagierten positiv
100 γ	1
500 γ	2

Die Tiere machten nach diesen Dosen von Flavonolen einen durchaus normalen Eindruck; die insgesamt 7 von 200 Tieren, die positiv reagierten, lassen erkennen, daß die ED 50-Werte noch erheblich höher liegen dürften. Mit der Schlundsondenmethode an der weißen Maus ergab sich somit keine Abführwirkung der untersuchten Flavonolderivate.

a) Beispiel eines Versuchsprotokolles

Untersuchte Lösung: in 100 ml 50 mg "Pursennid" + 200 mg Quercetin mit Zusatz von 1% Propylenglykol. Verabreichte Dosis 7 γ "Pursennid/g Maus.

Tier-Nr.	Gewicht	Dosis in γ	= ml Lösung	Reaktion	nach Stunden
A 1	25,5 g	178,5	0,357	+	3 1/4
A 2	23,5 g	164,5	0,329	-	-
A 3	25,0 g	175,0	0,35	+	2 3/4
A 4	25,0 g	175,0	0,35	-	-
A 5	22,5 g	157,5	0,315	+	2
A 6	20,0 g	140,0	0,28	-	-
A 7	26,0 g	182,0	0,364	-	-
A 8	24,0 g	168,0	0,336	+	4
A 9	18,5 g	129,5	0,259	-	-
A 10	24,0 g	168,0	0,336	+	2 1/2
A 11	22,0 g	154,0	0,308	+	5
A 12	24,5 g	171,5	0,343	-	-
A 13	23,0 g	161,0	0,322	-	-
A 14	25,5 g	178,5	0,357	+	5 1/4
A 15	21,0 g	147,0	0,294	-	-
A 16	23,0 g	161,0	0,322	+	3 1/2
A 17	22,5 g	157,5	0,315	+	4 1/4
A 18	25,0 g	175,0	0,35	+	3 3/4
A 19	24,0 g	168,0	0,336	-	-
A 20	19,0 g	133,0	0,266	+	2 1/2

Es reagierten positiv 11 von 20 Tieren = 55 %.

2. Versuche am isolierten Darm

Wir arbeiteten nach der Methode von R. MAGNUS³⁹⁾ mit isolierten Dickdarmstücken vom Meerschweinchen und Kaninchen^{*)}. Versuche von L. SCHMIDT⁴²⁾ hatten ergeben, daß bei Prüfungen von Abführmitteln der Dickdarm dem Dünndarm hinsichtlich Erregbarkeit weit überlegen war.

Unsere Substanzen wurden in Propylenglykol gelöst, jedoch nach L. SCHMIDT darauf geachtet, daß die Konzentration der Badeflüssigkeit an Propylenglykol nie mehr als 0,2% betrug. Das Badegefäß hatte ein Fassungsvermögen von 40 ml.

Wir stellten fest, daß sich das Meerschweinchencolon nicht für die Untersuchung einer Beeinflussung der Darmtätigkeit eignete, da nicht einmal die Gabe von 100 γ "Laxans Thomae", einem bekannten Dickdarm-erregenden Mittel (L. SCHMIDT³¹⁾), den Tonus oder die Peristaltik des Darmes zu erhöhen vermag (Abb. 16). Am Kaninchen-Dickdarm erhielten wir mit 50 γ dieser Substanz eine deutliche Anregung der Peristaltik (Abb. 17).

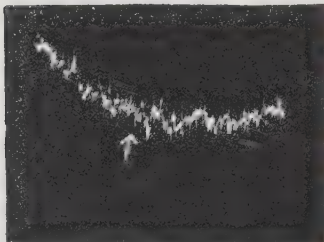


Abb. 16

Meerschweinchen-Colon

Beim Pfeil Zugabe von
100 γ "Laxans Thomae"

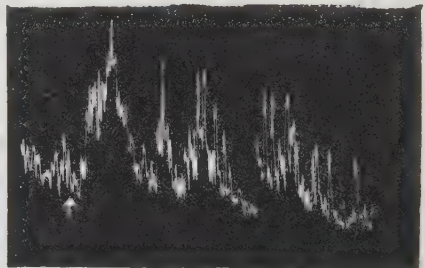


Abb. 17

Kaninchen-Colon

Beim Pfeil Zugabe von
50 γ "Laxans Thomae"

-
- 39) MAGNUS, R. Pflügers Arch.Ges.Physiolog.Menschen Tiere 102, 123 (1904)
42) SCHMIDT, L. Arzneimittel-Forsch. 3, 19 (1953)
31) SCHMIDT, L. Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 226, 219 (1955)
*) Fräulein A. Silbernagl, med.-techn.Assistentin am Inst.f. Pharmakologie, Toxikologie u. Pharmazie d. Tierärztl. Fakultät d. Universität München danken wir für die präparative Unterstützung.

Wir untersuchten an insgesamt 5 Präparaten den Einfluß von Rutin, Quercetin, Kämpferol und Kämpferol-3-glukosid auf die Darmbewegung. Alle Versuche verliefen negativ. Die höchste verwendete Dosis war bei diesen vier Flavonolderivaten 5 mg auf 40 ml oder $8 \cdot 10^{-3}$ als Konzentration (Abb. 18 - 21) der Badeflüssigkeit.

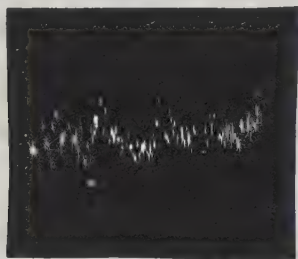


Abb. 18

Kaninchen-Colon
Beim Pfeil Zugabe von 5 mg
Rutin

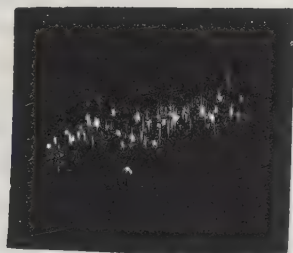


Abb. 19

Kaninchen-Colon
Beim Pfeil Zugabe von 2 mg
Quercetin



Abb. 20

Kaninchen-Colon
Beim 1. Pfeil Zugabe von 5 mg Kämpferol,
beim 2. Pfeil Zugabe von 50 γ "Laxans
Thomae"



Abb. 21

Kaninchen-Colon
Beim Pfeil Zugabe
von 5 mg Kämpferol-
3-glukosid

Somit erscheint auch nach der MAGNUS'schen Methode am isolierten Kaninchen-Dickdarm die abführende Wirkung von Flavonolderivaten als unwahrscheinlich.

3. Selbstversuche

Die Flavonoide Rutin, Quercetin und Rhamnetin standen nach Abschluß der pharmakologischen Versuche noch in größerer Menge zur Verfügung. Im Selbstversuch wurden 2mal je 1,0 g dieser drei Substanzen an sechs verschiedenen Tagen mit Wasser morgens eingenommen. Eine laxierende Wirkung war auch nicht andeutungsweise festzustellen. Wir beobachteten nur eine leicht erhöhte Diurese.

Auch hieraus ergibt sich, daß die beim Menschen zur Auslösung einer Abführwirkung benötigten Dosen außerhalb des pharmakologischen Interesses liegen.

D. Diskussion

Die pharmakologischen Versuche ergaben, daß

1. die in den Sennesblättern enthaltenen Flavonole keine Abführwirkung besitzen und
2. daß sie die Wirkung der in der Droge enthaltenen Anthranolglykoside nicht merklich verstärken.

Mit der ersten Feststellung stehen unsere Ergebnisse in Widerspruch mit den Angaben von T. FUKUDA³⁾. Dasselbe gilt auch für die Arbeit von L. SCHMIDT und E. SEEGER⁹⁾, welche fanden, daß das Flavonolderivat Quercetin in niedrigeren Dosen als den von uns untersuchten abführend wirkt.

Die japanische Arbeit ist bei näherer Betrachtung nicht sehr gut durch Zahlenmaterial fundiert. Über die bei Mäusen und Katzen abführenden Dosen von Kämpferolglykosid werden keine Angaben gemacht. Die einzige Dosisangabe wird bei einem klinischen Versuch angeführt: "Das wasserlösliche Kämpferolglykosid ruft bei einer Dosis von 0,8 g nach 4 bis 6 Stunden konstant Diarrhoe hervor. Es werden Kollern und ab und zu leichte Koliken beobachtet, aber keine Nachstörungen."

Auch über das Glykosid selbst werden keine chemischen Angaben bezüglich Zuckeranteil, Reinheit usw. mitgeteilt. Gewonnen wurde das wasserlösliche Kämpferolglykosid von I. SHIINA³⁸⁾ aus Semen Rhamni japonici; aus der gleichen Droge war von Y. SHIMOYAMA⁵³⁾ eine emodinähnliche Substanz isoliert worden. Es liegt somit im Bereich der Möglichkeit, daß das geprüfte Kämpferolglykosid durch Spuren eines Anthrachinonderivates verunreinigt war. Da derartige Substanzen ("Pursennid") schon in Dosen von ca. 25 mg ihre Wirkung entfalten, wäre damit vielleicht eine Erklärung für die abführende Wirkung die-

3) FUKUDA, T. Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 164, 685 (1932)

9) SCHMIDT, L. u. SEEGER, E. Arzneimittel-Forsch. 6, 22 (1956)

38) SHIINA, I. zit. in 3)

53) SHIMOYAMA, Y. zit. in 3)

ses Kämpferolglykosides gegeben. Selbst wenn die im klinischen Versuch verabreichten 0,8 g nur zu 3% mit einer wirksamen Anthrachinonsubstanz verunreinigt waren, konnte eine abführende Wirkung dieser Substanz eintreten. Jedenfalls ergab sich bei unseren Versuchen an der weißen Maus und im Selbstversuch, daß reine Flavonolderivate und deren Glykoside, wie das in der japanischen Arbeit beschriebene Kämpferol oder wie Quercetin, nicht abführend wirkten. Die geprüften Dosierungen bewegten sich dabei beim Tier und in einigen Selbstversuchen in 40 bis 100mal größerer Höhe als sonst gebräuchliche, zuverlässige Abführmittel wie "Pursennid" (25 mg) oder "Laxans Thomae" (10 mg).

Drogen, die außer Flavonolderivaten keine abführenden Stoffe enthalten, können deshalb in den Mengen, in denen sie etwa zu Teeaufgüssen verwendet werden, wohl kaum eine abführende Wirkung entfalten. Die in diesen Zubereitungen vorliegenden Konzentrationen an Flavonolen liegen weit unter den von uns untersuchten Mengen.

In der Arbeit von L. SCHMIDT und E. SEEGER⁹⁾ wurde als Versuchstier die weiße Ratte verwendet. Die Autoren fanden dort Quercetin in einer Dosis von 200 bis 250 mg/kg Ratte = 200 bis 250 γ /g als abführend. Möglicherweise ist die weiße Maus unempfindlicher gegen Flavonolglykoside als die Ratte, vielleicht spielt auch die Verabreichung der Substanzen in öligiger Suspension bei L. SCHMIDT und E. SEEGER eine Rolle; jedenfalls beobachteten wir bei keinem der untersuchten Flavonolderivate in dieser Dosierung eine Abführwirkung. Auch ist die von L. SCHMIDT und E. SEEGER gefundene wirksame Dosis im Vergleich zu den anderen von ihnen untersuchten Abführmitteln 10- bis 100mal höher.

Hinsichtlich der Beziehung zwischen chemischer Konstitution und laxierender Wirkung sei auch auf die Arbeiten von O. E. SCHULTZ und L. GELLER⁵⁴⁾ verwiesen, die Substanzen vom

-
- 9) SCHMIDT, L. u. Arzneimittel-Forsch. 6, 22 (1956)
SEEGER, E.
54) SCHULTZ, O. E. u. Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.
GELLER, L. 287, 582 (1954) u. 288, 234 (1955)

Flavonoltypus keine besondere Bedeutung als Abführmittel zu messen.

Die synergistische Wirkung der Flavonole auf die Hauptinhaltsstoffe der Folia Sennae wurde bisher noch nicht experimentell festgestellt, sondern nur auf Grund der schon diskutierten Arbeit von T. FUKUDA³⁾ vermutet. In Versuchen stellte sich bei einem großen Tiermaterial in unserer Arbeit diese Annahme als unzutreffend heraus. Die restliche biologische Aktivität der Droge dürfte zu einem Teil dem Synergismus zwischen dem dritten "non rhein glycoside" (J. W. FAIRBAIRN und M. R. I. SALEH¹⁰⁾ und den Sennosiden zukommen. H. AUTERHOFF⁵⁵⁾ konnte dies bestätigen. Eine Beteiligung weiterer Stoffe, wir denken vor allem an die Ballaststoffe der Droge, wäre erst noch zu untersuchen. Von den bekannten Inhaltsstoffen wurde der Einfluß des Schleimes von J. W. FAIRBAIRN und M. R. I. SALEH¹⁰⁾ bereits als negativ angesehen. In unseren Untersuchungen hatte ein Tylosezusatz von 1% (= 20fache Menge "Pursennid") die ED 50 des "Pursennids" von 6,3 auf 5,5 γ vermindert. Es ist denkbar, daß die in der Droge vorhandenen Zellulosederivate in gleicher Weise, etwa durch Quellung, wirken.

Die von uns gefundenen ED 50-Werte des "Pursennids" bewegten sich in etwa der gleichen Höhe wie bei einer anderen von F. MESTWERDT³⁶⁾ vor 6 Jahren durchgeführten Versuchsreihe. Die Tatsache, daß bei uns schon etwa 2/3 der ED 50 nach F. MESTWERDT³⁶⁾ wirkt, dürfte in der etwas abgeänderten Methodik zu suchen sein. Wir erachteten es als positiv, wenn untergelegtes Filtrierpapier, von der Unterseite betrachtet, durch einen Kotballen braun gefärbt war; F. MESTWERDT³⁶⁾ sah eine zweimalige breiige oder einmalige schmierig-schleimige Entleerung als positiv an.

-
- | | |
|--|---|
| 3) FUKUDA, T. | Arch.exp.Pathol.Pharmakol. <u>164</u> , 685 (1932) |
| 10) FAIRBAIRN, J. W.u. SALEH, M. R. I. | J.Pharmacy Pharmacol. <u>3</u> , 93 u. 918 (1951) |
| 55) AUTERHOFF, H. | Planta Medica <u>1</u> , 97 (1953) |
| 36) MESTWERDT, F. | Dissertation, Würzburg 1952, Pharmakologisches Institut |

IV. Gesamtzusammenfassung

1. Bei einer näheren Untersuchung der bisher bekannten flavonolischen Bestandteile von Folia Sennae Tinnevelly wurden papierchromatographisch und spektrophotometrisch vier Flavonolglykoside identifiziert:
 - a) Kämpferoldiglukosid
 - b) Isorhamnetindiglukosid,
 - c) Quercetindiglukosid und
 - d) Isorhamnetindiglukosid.
2. Die vier Substanzen lagen nach spektrophotometrischer quantitativer Untersuchung zusammen in etwa 1%iger Menge in der Droge vor. Anthranolglykoside sind durchschnittlich zu 3% in der Droge enthalten. Das Verhältnis der Anthranole zu den Flavonolen ist also etwa 3 : 1.
3. Vergleichende Untersuchungen an der weißen Maus ergaben, daß dem "Pursennid", dem Hauptinhaltsstoff der Droge, nur etwa 73% der abführenden Wirkung zukommt.
4. Im Drogenverhältnis 3 : 1, aber auch in bis zu 10mal stärkerer Flavonolkonzentration, stellt sich keine Verstärkung der "Pursennid"-Wirkung durch Flavonole an der weißen Maus ein. Die Flavonole sind deshalb am Wirkungsmechanismus der Senneblätter nicht beteiligt.
5. Eine Erregung des isolierten Kaninchen-Dickdarmes durch Flavonole war nicht zu erzielen, obwohl dazu eine Menge verwendet wurde, die hundertmal größer war als das vergleichsweise untersuchte Abführmittel "Laxans Thomae" ((4,4'-Diacetoxy-diphenyl)-(pyridyl-2)-methan)).
6. Flavonole in 80mal stärkerer Konzentration als "Pursennid" hatten bei der weißen Maus und in Versuchen am Menschen keine laxierende Wirkung.
7. Die Flavonole besitzen deshalb keine Bedeutung als Abführmittel.

L e b e n s l a u f

Am 12. September 1930 wurde ich, Wolfgang Adolf Ferdinand Schlemmer, als Sohn des Universitätsprofessors Dr. Ferdinand Schlemmer und seiner Frau Elfriede, geb. Beiswenger in München geboren.

Nach 3jährigem Besuch der St. Anna-Volksschule in München vom April 1937 bis April 1940 trat ich in das Wilhelms-Gymnasium über und besuchte dieses bis Ende 1941. Infolge beruflicher Versetzung meines Vaters an die damalige deutsche Reichsuniversität Straßburg besuchte ich dort bis zur Besetzung 1944 das Jakob-Sturm-Gymnasium. Durch die Nachkriegsverhältnisse bedingt, absolvierte ich meine letzten Schuljahre am Eberhard-Ludwigs-Gymnasium in Stuttgart und bestand dort auch nach neun Klassen am 10. Juni 1949 die Reifeprüfung.

Vom 1. Oktober 1949 bis 1. Oktober 1951 war ich Praktikant in der Engel-Apotheke in München und bestand im Herbst 1955 in München auch das pharmazeutische Vorexamen.

Vom Wintersemester 1951/52 an immatrikulierte ich mich an der Universität München zum Studium der Pharmazie und legte dort im Mai 1955 die pharmazeutische Staatsprüfung ab.

Seit dieser Zeit fertigte ich unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer, Direktor des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, und Herrn Professor Dr. K. Zipf, Direktor des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, die vorliegende Dissertation an.

Seit 1. Januar 1956 bin ich am Institut von Herrn Professor Dr. K. Zipf als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle tätig.

LEBENSLEISTUNG

Im Jahre 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

Am 12. September 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

Im Jahre 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

Im Jahre 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

Im Jahre 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

Im Jahre 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

Im Jahre 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

Im Jahre 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

Im Jahre 1910 wurde der Herr Professor Dr. E. E. Niggli in die Universität Zürich berufen. Er war vorher an der Universität Göttingen tätig. Er war ein hervorragender Forscher auf dem Gebiet der Zoologie und der Anatomie. Er war ein hervorragender Lehrer und ein hervorragender Mitarbeiter. Er war ein hervorragender Mensch.

